

Tumorhemmende C- und N-Mannich-Basen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der naturwissenschaftlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt

von

Friedrich Schmidt

aus

Berchtesgaden

München 1970



Berichterstatter:

1. Professor Dr. H. Schönenberger
2. Professor Dr. Dr. h. c. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.1970

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München durchgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von

Herrn Prof. Dr. H. Schönenberger,

dem ich für die wissenschaftliche Anleitung und Betreuung zu großem Dank verpflichtet bin.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. E. Bamann danke ich für die Förderung meiner Arbeit und für das persönliche Interesse und Wohlwollen.

Herrn Prof. Dr. E. Grundmann und Herrn Dr. D. Steinhoff, Institut für Experimentelle Pathologie der Farbenfabriken Bayer AG, danke ich für die Prüfung der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene und 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane am Mammacarcinom der Ratte.

Herrn Universitätsdozenten Dr. A. Petter, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, möchte ich gleichfalls meinen Dank für die Unterstützung bei der Prüfung der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene und 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane auf coronardilatierende Wirkung aussprechen.

Herrn Dr. R. Hiltmann, Pharmazeutisch-Wissenschaftliches Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG, danke ich für die Anfertigung von Elementaranalysen und Spektren.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Tumorhemmende 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene und 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane	3
I. 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene	4
II. 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane	24
III. Coronardilatierende Wirkung der aminomethylierten Stilb-östrole und Hexöstrole	33
C. Tumorhemmende acylierte N-Lost-Aminale	38
D. α -Aminoalkylantien. Synthese und Prüfung auf tumorhemmende Wirkung	72
I. Trihydroxymethyl-melamin. Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen Struktur und tumorhemmender Wirkung	80
II. Hexahydro-s-triazine	92
III. N-Halbacetale und Aminale von Äthylurethan, Harnstoff, Biuret und Dicyandiamid	100
E. Experimenteller Teil	112
I. Synthese der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene und 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane	112
II. Synthese der N-Lost-N-Mannich-Basen	116
III. Synthese der s-Triazin-Derivate	119

	Seite
IV. Synthese der N-Halbacetale und Aminale von Äthylurethan, Harnstoff, Biuret und Dicyandiamid	120
V. Synthese der Hexahydro-s-triazine	123
VI. Ermittlung der physikalisch-chemischen Daten	126
1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten	126
2. Bestimmung der Basenlöslichkeit	126
3. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten	127
VII. Chromatographische Methoden	128
VIII. Quantitative Bestimmung von Formaldehyd und Cystein (52)	129
IX. Quantitative Bestimmung von Formaldehyd mit Phloro- glucin (76)	130
X. Messung der Cl^- -Hydrolyse	131
XI. Bestimmung der Reaktivität (Aminomethylierung von Morpholin)	131
XII. Prüfung auf tumorhemmende Wirkung	132
1. Bestimmung der Toxizität	132
2. Prüfung am Yoshida-Sarkom der Ratte	132
3. Prüfung am Sarkom 180 der Maus	133
4. Prüfung am Mammacarcinom der Sprague-Dawley-Ratte	133
XIII. Prüfung am isolierten Meerschweinchen-Herzen nach Langen- dorff	135
XIV. Methodik der mikrobiologischen Testung	136
1. Nährmedium	136
2. Testung auf Fungistase	136
3. Testung auf Bakteriostase	137
F. Zusammenfassung	138
G. Literaturverzeichnis	141

H. Anhang

Tumorwachstumskurven der geprüften Verbindungen am

Yoshida-Sarkom der Ratte

- 1 -

Sarkom 180 der Maus

- 17 -

Mammacarcinom der Sprague-Dawley-Ratte

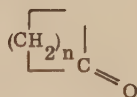
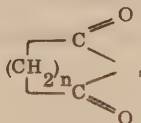
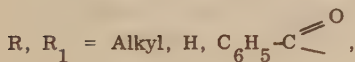
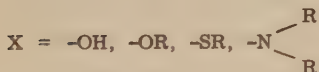
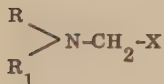
- 24 -

A. Einleitung

Über die antimikrobielle und tumorhemmende Wirkung von C- und N-Mannich-Basen liegen zahlreiche Angaben vor.

In der Klasse der C-Mannich-Basen wurden β -Amino-ketone und α -Amino-o-cresole untersucht. β -Amino-ketone zeigen fungistatische und carcinostatische Eigenschaften (97). Sie beruhen auf der Fähigkeit der β -Amino-ketone zur Acyl-äthylierung und Aminomethylierung biologischer Substrate (32). α -Amino-o-cresole sind gegen Bakterien und Pilze wirksam; sie zeigen eine spezifische Wirkung gegen die Erreger der Malaria (11-29).

Bei N-Mannich-Basen wurden Verbindungen folgender Struktur



an verschiedenen Mäuse- und Rattentumoren geprüft und für wirksam befunden. Es wurden Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus vorgenommen (56-59, 84, 85).

Neuerdings konnte gezeigt werden, daß sich Vertreter aus der Klasse der acylierten Lost-Aminale durch hervorragende tumorhemmende Eigenschaften auszeichnen, die denen bekannter Alkylantien überlegen sind (52).

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen über tumorhemmende C-Mannich-Basen beschrieben, die auf früheren Untersuchungen unseres Arbeitskreises aufbauen (Kapitel B).

Weiterhin erfährt die Klasse der monoacylierten Nor-Lost-Aminale eine eingehende Bearbeitung. Es werden Struktur-Wirkungsstudien und wirkungsmechanistische Untersuchungen durchgeführt (Kapitel C).

Ausgehend von der bekannten Wirkung des Tumorchemotherapeuticums Trihydroxymethyl-melamin werden die Entwicklung weiterer Wirkstoffe dieses Typs versucht und wirkungsmechanistische Betrachtungen angestellt (Kapitel D).

- B. Tumorhemmende 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene und 3,4-Bis(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane

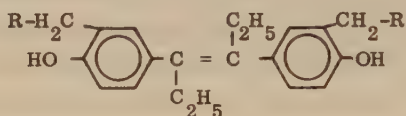
In Fortführung von Arbeiten unseres Arbeitskreises über antimikrobielle und tumorhemmende C-Mannich-Basen, die zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der β -Amino-ketone führten (32), wurden zu Beginn dieser Untersuchungen aminomethylierte Acetonitrile, Picoline, Chinoline, Indole, Phenole und Naphthole orientierend auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften geprüft. Da unter diesen Verbindungen nur ein Chinolin- und ein Diphenyl-acetonitril-Derivat (N,N-Dimethylamino-methyl-chinolin und N,N-Dimethylamino-methyl-diphenyl-acetonitril) an Pilzen eine Hemmung in Verdünnungen von 16 - 64 $\mu\text{g/ml}$ hervorriefen, wurde eine Erweiterung dieser Versuche vorläufig zurückgestellt.

Dagegen war die Beobachtung einer schwachen, aber spezifischen tumorhemmenden Wirkung am Mammacarcinom der Ratte durch 3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben und 3-Dimethylamino-methyl-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben (1) von so großem Interesse, daß die Verbindungsklasse der aminomethylierten Stilböstrole und weiterhin die der aminomethylierten Hexöstrole einer eingehenden Untersuchung unterzogen wurden.

I. 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene

Es wurde versucht, bei Verbindungen vom Typ des 3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbens durch Variieren des Aminomethylrestes zu besser wirkenden Verbindungen zu gelangen.

Hierzu wurden folgende Verbindungen synthetisiert:



- I R : $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$ 3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben (1)
- II R : $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_3 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{CH}_2\text{-CH}_3 \end{array}$ 3,3'-Bis-(diäthylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben
- III R : $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2 \end{array}$ 3,3'-Bis-(pyrrolidino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben
- IV R : $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2 \end{array}$ 3,3'-Bis-(piperidino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben

Die neuen Verbindungen sind von allgemeinem pharmakologischen Interesse. Sie enthalten die α -Amino-o-cresol-Struktur, die in zahlreichen biologisch aktiven Verbindungen zu finden ist.

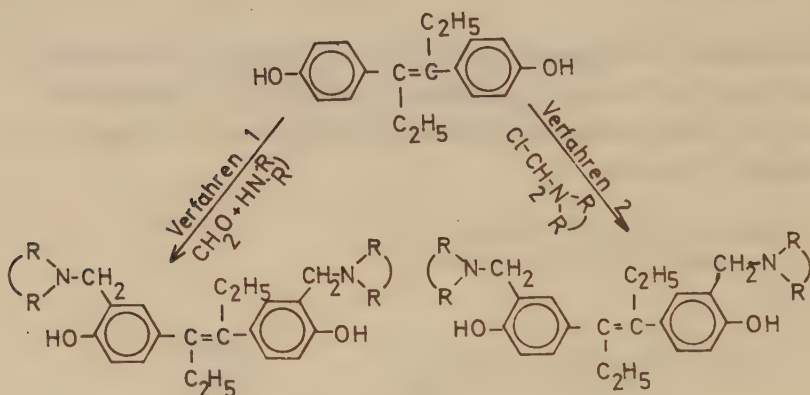
In der Literatur wird über α -Amino-o-cresole mit spasmolytischen (3), oitocischen (4-9) und antifibrillatorischen (10) Eigenschaften berichtet. Besonders eingehende Untersuchungen liegen über die antimikrobielle Wirkung dieser Verbindungsklasse vor (11-18). So ist beispielsweise die Verbindung 2-Methyl-4-cyclohexyl-6-(methylamino-methyl)-phenol noch in einer Verdünnung von 1 : 100 000 gegen Dermatophyten wirksam (17). Eine Wirkung gegen Malaria zeigen strukturell verschiedenartige α -Amino-o-cresole (19-29). Besonders wirksam ist die Verbindung N-[7-Chlor-chinolyl(4)]-2-diäthylamino-methyl-4-amino-phenol (Camochin) (21). Von schwachen tumorhemmenden Eigenschaften berichten Kuehne et al. (30) im Rahmen von Untersuchungen über cytostatisch wirksame Dihydro-m-benzoxazine.

Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf Chemie und tumorhemmende Wirkung der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene.

Über ihre pharmakologische Prüfung auf coronardilatierende Wirkung wird im Abschnitt III berichtet.

Synthese

Die Herstellung der Verbindungen I-IV erfolgte durch Umsetzung von Diäthylstilböstrol, Paraformaldehyd und Amin - Molverhältnis 1:2:2 - (Verfahren 1), oder durch Reaktion des Dinatriumsalzes von Diäthylstilböstrol mit Chlormethylamin - Molverhältnis 1:2 - (Verfahren 2).



Verfahren 1: Durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Synthese der Verbindung I nach diesem Verfahren in siedendem Dioxan nach 1 Stunde beendet ist. In siedendem Alkohol werden für einen quantitativen Ablauf dieser Reaktion etwa 10 Stunden benötigt. Analoge Umsetzungen mit Diäthylamin, Pyrrolidin und Piperidin (Verbindung II-IV) verlaufen nicht so eindeutig. Dünnschichtchromatographisch kann neben dem jeweiligen 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben eine weitere Verbindung nachgewiesen werden, die in größeren Mengen anfällt und bei der es sich vermutlich um das Monoaminomethyl-Derivat handelt (siehe dazu Seite 25). Bei längerer Reaktionsdauer lassen sich daneben noch weitere Verbindungen, die in niedriger Konzentration vorliegen, nachweisen. Es handelt sich dabei vermutlich um höher

molekulare Kondensationsprodukte.

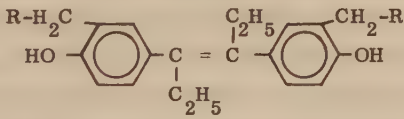
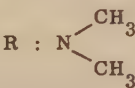
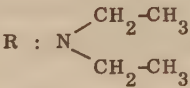
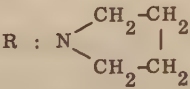
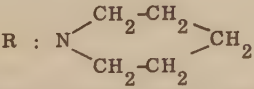
Verfahren 2: Die Verbindungen II-IV können in reiner Form und in annehmbaren Ausbeuten (50 - 60% der Theorie) durch Umsetzung von Stilböstrol in Form seines Dinatriumsalzes mit den entsprechenden Chlormethylamin-Derivaten gewonnen werden. Als Lösungsmittel dient Acetonitril, die Reaktionstemperatur liegt zwischen 50 und 60°, die Reaktionszeit beträgt etwa 1 Stunde. Das freie Stilböstrol setzt sich mit Chlormethylamin-Derivaten in Äther, Dioxan oder Acetonitril nur sehr schlecht um.

Tabelle 1 hRf-Werte der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene

Trägerschicht: Kieselgel GF₂₅₄

Fließmittel: Chloroform/Cyclohexan/Methanol/NH₃ - ges.

Chloroform (50:40:10:10 Vol. Tle)

	
Verbindung	hRf
I R : 	58
II R : 	65
III R : 	38
IV R : 	78

In Übereinstimmung mit der α -Amino-o-cresol-Struktur der Verbindungen I-IV stehen:

1. Die Fähigkeit, mit Cu^{++} -Ionen Chelate zu bilden (1).

2. Die IR-Spektren.

Es fehlt die breite Bande des 4,4'-Dihydroxy- α, β -diäthylstilbens bei 3420 cm^{-1} (Abb. 1), die, wie der Vergleich mit 4,4'-Dimethoxy- α, β -diäthylstilben zeigt, der assoziierten OH-Gruppe zuzuordnen ist (zwischenmolekulare H-Brückenbeziehung).

Als Folge innermolekularer Wechselbeziehungen zwischen den phenolischen OH-Gruppen und den $\left(\begin{smallmatrix} \text{R} \\ \text{R} \end{smallmatrix} \right) \text{-N-CH}_2$ -Gruppen der beiden Benzolringe ist diese Bande bei den 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilbenen in den Absorptionsbereich starker innermolekularer H-Brückenbindungen verschoben (Abb. 1). Die Lage der neuen Bande ist im Konzentrationsbereich von 0,1 - 0,001 Mol/l unverändert, ein Zeichen für eine innermolekulare Wechselbeziehung (Abb. 2). Bei der monosubstituierten Verbindung 3-Dimethylamino-methyl-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben ist die zwischenmolekulare H-Brückenbeziehung abgeschwächt erhalten und nach 3380 cm^{-1} verschoben.

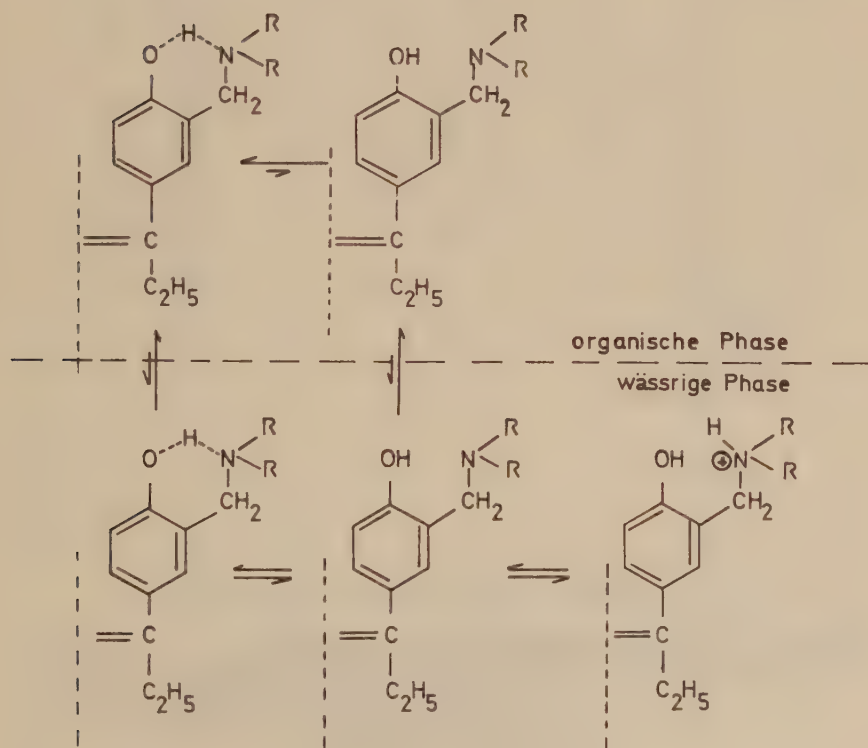
3. Die hydrogenolytische Spaltung.

Durch katalytische Hydrierung (180° , 175 atü, Cu-chromit) gelingt die Überführung von 3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben in 3,3'-Dimethyl-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben (1).

4. Die Unlöslichkeit in Natronlauge.

Man nimmt an, daß diese Erscheinung auf der Ausbildung einer starken innermolekularen Wasserstoffbrücke zwischen phenolischer OH-Gruppe und Alkylamino-Gruppe beruht (2).

Auch die hohen K-Werte im Lösungsmittelsystem Ligroin/Methanol/Phosphatpuffer pH 7,35 lassen sich so erklären (Tab. 2). Die Verbindungen sind bei pH 7,35 zu ca. 99% protonisiert. In das Verteilungsgleichgewicht geht lediglich die freie Base ein; korrespondierende Chlorid- und Phosphationen sind in der organischen Phase nicht nachweisbar. Durch die Bildung einer starken H-Brücke zwischen den Hydratationszentren $-\text{CH}_2-\text{N}^{\text{R}}_{\text{R}})$ und $-\text{OH}$ ergibt sich der extrem lipophile Charakter der Base, der das Verteilungsverhalten der Base wesentlich bestimmt.



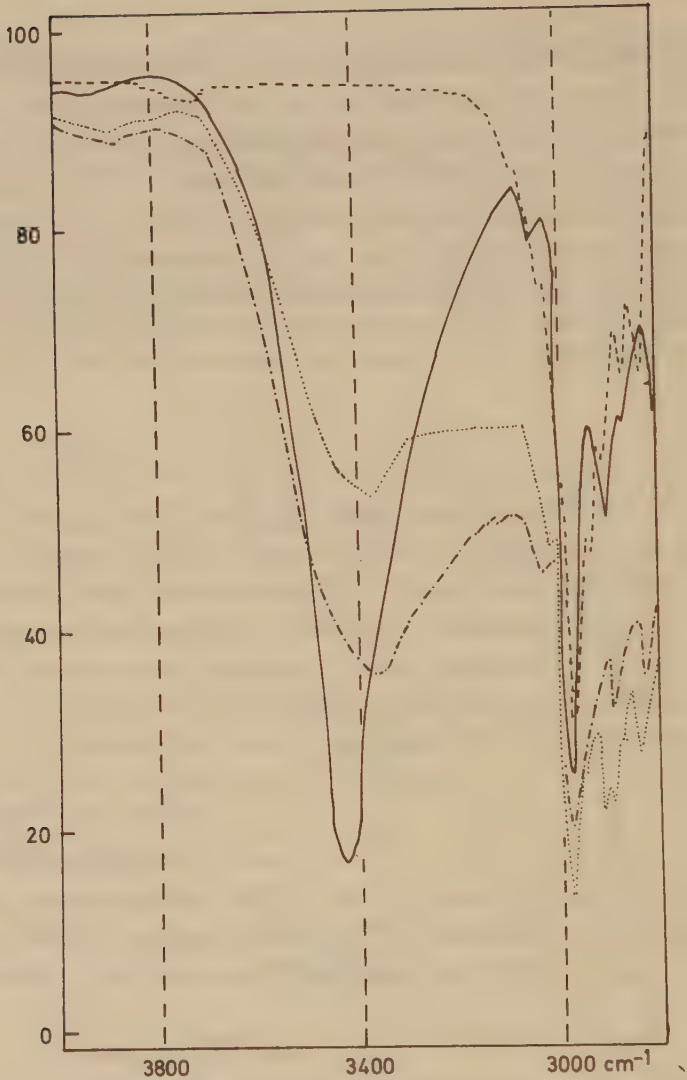


Abbildung 1: OH-Schwingungsbereich der Verbindungen

- 4,4'-Dihydroxy- α, β -diäthylstilben (0,375 % KBr)
- - - 4,4'-Dimethoxy- α, β -diäthylstilben (0,01 Mol CCl_4)
- · - · 3-(Dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben (0,01 Mol CCl_4)
- 3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben (0,01 Mol CCl_4)

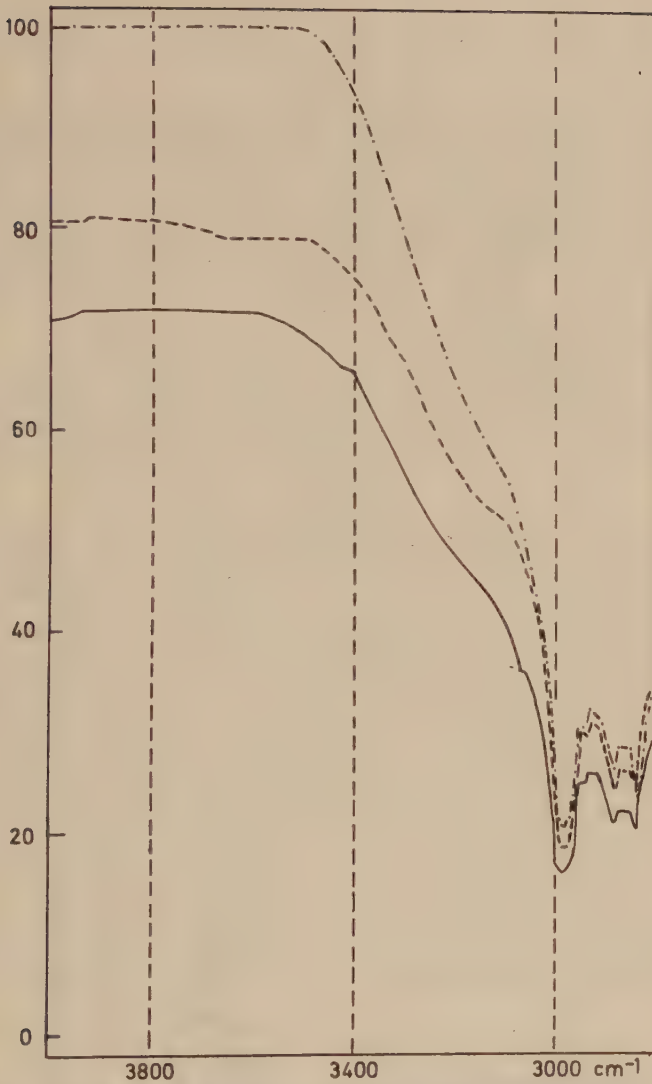
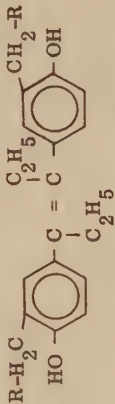


Abbildung 2: OH-Schwingung von 3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben in einem Konzentrationsbereich von 0,001 - 0,1 Mol CCl_4

—	0,001 Mol
- - -	0,01 Mol
.....	0,1 Mol

Tabelle 2: Physikalisch-chemische Eigenschaften der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene

				
	$\text{R} : \text{N} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\text{R} : \text{N} \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	$\text{R} : \text{N} \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	$\text{R} : \text{N} \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$
Verteilungskoeffizient K (Ligroin/Methanol/Phosphatpuffer pH 7,35)	12,1	25,2	12,5	25,0
Trübungs-pH (0,1 Mol/l, 20°)	6,1	5,5	6,3	5,6
Wasserlöslichkeit der Base (mMol/l, 20°)	0,032	0,043	0,06	0,12
Gesamtlöslichkeit der Substanz (mMol/l, pH 7,35, 20°)	5,42	2,47	26,1	1,82
p'K _a -Wert (H ₂ O)	9,6	9,1	9,5	8,5
Prozentanteil protonierte Base bei pH 7,35	99,4	98,3	99,7	93,4

Untersuchungen über tumorhemmende Wirkung

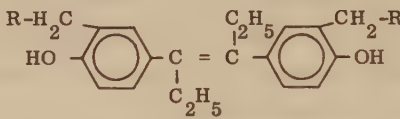
Die Prüfung der neuen Verbindungen auf tumorhemmende Eigenschaften erfolgte am Yoshida-Sarkom der Ratte, am Sarkom 180 der Maus und am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Sprague-Dawley-Ratte. Zu Vergleichszwecken wurde die von Adam (1) am DMBA-induzierten Mammacarcinom als schwach wirksam erkannte Verbindung I in die Testung miteinbezogen.

Die $DL_{50(1)}$ der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene liegt bei der Ratte zwischen 140 und 290 mg/kg. Toxische Dosen rufen an der Ratte tonisch-klonische Krämpfe mit Atemlähmung hervor. Von subletalen Dosen erholen sich die Tiere wieder sehr schnell (Tab. 3).

Am Yoshida-Sarkom und am Sarkom 180 zeigen die Verbindungen I-IV keine nennenswerte tumorhemmende Wirkung (Tab. 4 und 5). Dagegen konnten am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte beachtliche Hemmeffekte beobachtet werden. Wie aus Tab. 6 zu ersehen ist, besitzt die von Adam (1) am DMBA-induzierten Tumor als schwach wirksam beschriebene Verbindung I auch am Benzidin-induzierten Mammatumor nur eine geringe Wirkung. Ähnlich ungünstige Befunde wurden mit der Verbindung III erzielt. Eine beachtliche Wirkung ist dagegen bei Verbindungen mit Diäthylamino-methyl- und Piperidino-methyl-Gruppen in den beiden Benzolringen (II und IV) zu verzeichnen. Die Verbindungen II (Abb. 3) und IV (Abb. 4) bewirken während der Therapie einen Wachstumsstillstand des Mammacarcinoms. Im Falle der Verbindung IV kommt es sogar zu einem Rückgang des Tumors (zwischen 30. und 50. Versuchstag), obwohl die Therapie bereits am 18. Tag beendet wurde.

Die fehlende carcinostatische Wirkung an Impftumoren und die Beobachtung von Adam (1) - aminomethylierte Stilböstrole weisen im Gegensatz zu anderen aminomethylierten Phenolen keine antimikrobiellen Eigenschaften auf -, deuten daraufhin, daß diese Verbindungen ihre Wirkung am Mammacarcinom der Ratte nicht aufgrund cytostatischer Eigenschaften entfalten. Auch die geringe Toxizität ist ein Hinweis darauf.

Tabelle 3: Toxizität der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -di-äthylstilben-Dihydrochloride bei einmaliger ip. Applikation an Ratte und Maus

				
	DL ₅₀ (1) mg/kg		Zubereitungsform	
	Ratte	Maus		
I	$R : \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	250	155	5% wäßr. Susp.
II	$R : \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	280	165	"
III	$R : \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{N} \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	140	90	"
IV	$R : \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{N} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	290	350	"

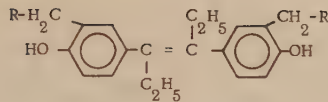


Tabelle 4: Prüfung am Yoshida-Sarkom der Ratte

	Gesamtdosis		Tierzahl		Tumorgew. ¹⁾		Mittl. Lebensdauer in Tg.		Wachstumshemmung in % ³⁾
	mg/kg	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	
$\text{R: N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	300	5	5	7	4,7	7,7	37,2	23,4	39
$\text{R: N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	300	5	5	7	9,2	7,7	20,2	23,4	-
$\text{R: N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	150	5	5	7	7,1	7,7	26,8	23,4	-
$\text{R: N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \end{array}$	375	5	5	7	7,9	7,7	21,6	23,4	-

Tabelle 5: Prüfung am Sarkom 180 der Maus

	Gesamtdosis		Tierzahl		Tumorgew. ²⁾		Wachstumshemmung in % ³⁾	Signifikanz ⁴⁾
	mg/kg	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
$\text{R: N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	200	8	18	19	1,02	1,16	-	-
$\text{R: N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	200	8	20	19	1,24	1,16	-	-
$\text{R: N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	120	8	16	19	0,76	1,16	32	-
$\text{R: N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \end{array}$	320	8	16	19	1,04	1,16	-	-

- 1) mittleres Tumorgewicht in g 7 Tage nach Therapiebeginn
- 2) " " " " 10 " " der Transplantation
- 3) Abweichung des mittleren Tumorgewichtes der behandelten Tiere vom mittleren Tumorgewicht der unbehandelten Kontrolltiere
- 4) Berechnung nach Winne (42)

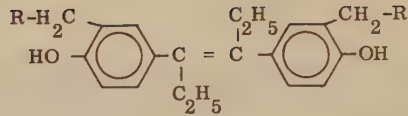


Tabelle 6: Prüfung am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte

		Gesamtdosis		Tumor- wachstums- hemmung ¹⁾
		in mg/kg	verteilt auf Tage	
I	$\text{R} : \text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	1.350	45	(+)
II	$\text{R} : \text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	400	40	+++
III	$\text{R} : \text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	1.040	52	(+)
IV	$\text{R} : \text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	10.000	18	+++

- 1) der Grad der Tumorwachstumshemmung wird in 4 Stufen gegliedert:
- (+) verzögerter Wachstumsanstieg im Vergleich zur Kontrolle
- + totale Wachstumshemmung bis 10 Tage nach Therapiebeginn
- ++ " " " 20 " " "
- +++ " " " > 20 " " "

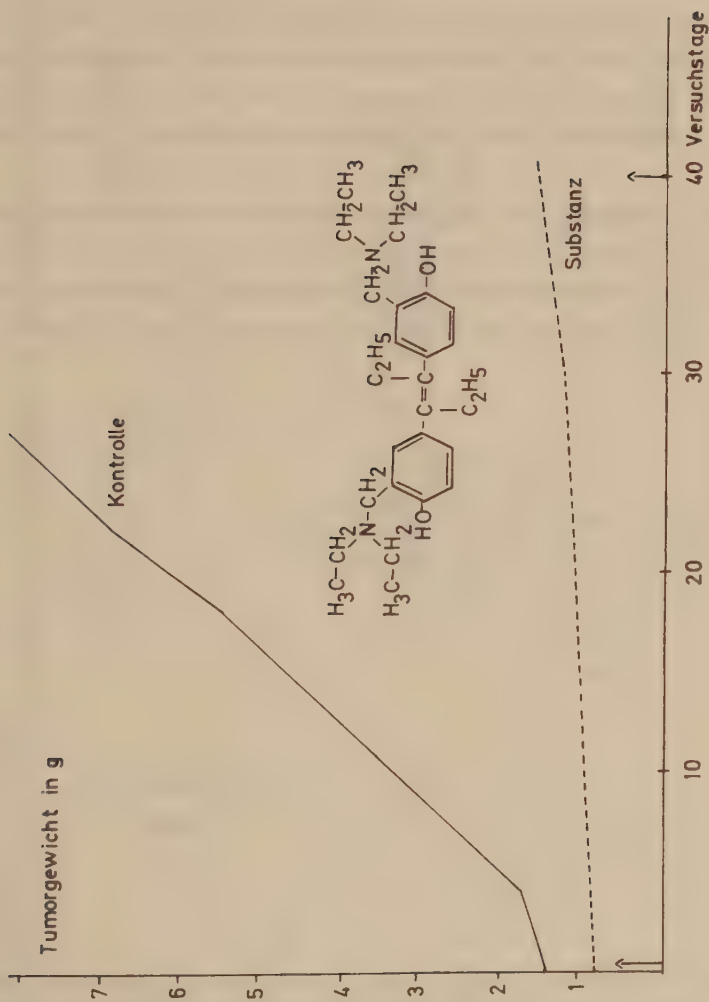


Abbildung 3:

Wirkung von 3,3'-Bis-(diäthylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (II) am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte

Dosis: 400 mg/kg auf 40 Tage verteilt

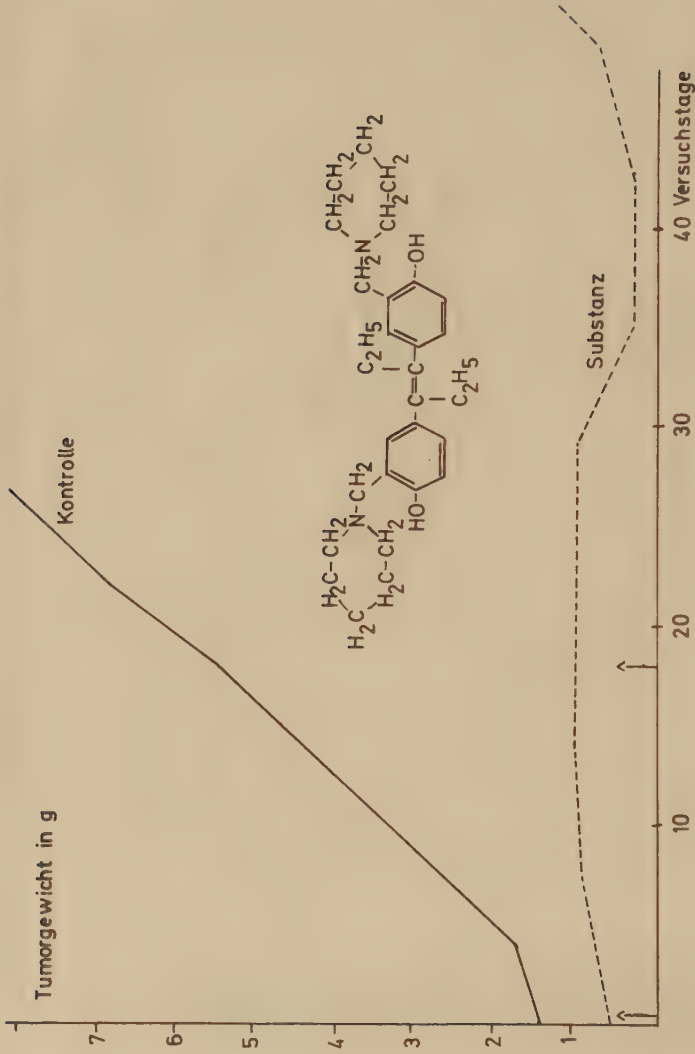
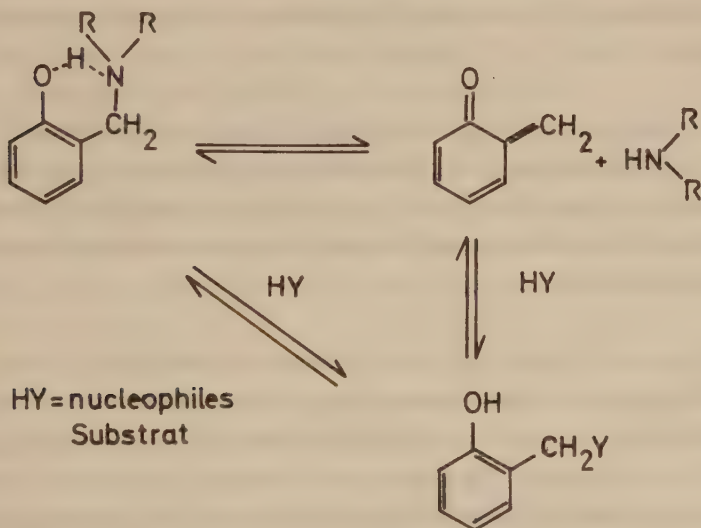


Abbildung 4: Wirkung von 3,3'-Bis-(piperidino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben (IV) am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte
Dosis: 20.000 mg/kg auf 18 Tage verteilt

Wirkungsmechanistische Betrachtungen

Ursprünglich diskutierten wir für aminomethylierte Stilböstrole (1) einen Wirkungsmechanismus, wie er von Schönenberger et al. (32) für antimikrobielle und tumorhemmende β -Aminoketone angegeben wurde. Danach entfalten Keton-Mannich-Basen ihre Wirkung durch Acyläthylierung biologischer Substrate.

Phenol-Mannich-Basen sind ebenfalls in der Lage, mit nucleophilen Verbindungen ($R-SH$, $R-NH_2$) unter Austausch der Aminogruppe zu reagieren (33). Als Mechanismen werden eine Eliminierungs-Additions-Reaktion und eine direkte nucleophile Substitution unter Verdrängung der Aminogruppe diskutiert (33, 34).



Reaktionen dieser Art sind bisher nur unter präparativen Bedingungen vorgenommen worden (33). Die Frage, ob α -Amino-o-cresole, ähnlich wie β -Aminoketone, auch unter physiologischen Bedingungen mit biologisch wichtigen, nucleophilen Substanzen reagieren und auf diese Weise cytostatisch wirken, ist ungeklärt.

Stabilitätsuntersuchungen in wäßriger Lösung bei pH 7,35 und 37⁰, die von uns am Beispiel der Verbindung I vorgenommen wurden, ergaben innerhalb einer Beobachtungszeit von 24 Stunden keine Zersetzung. Es konnten dünnschichtchromatographisch keine Spaltprodukte nachgewiesen werden.

Zur Prüfung auf Reaktivität mit nucleophilen Substraten unter physiologischen Bedingungen wurde die Verbindung I mit Cystein versetzt und dessen Verbrauch nach 24 Stunden durch Zugabe von Formaldehyd und Titration der Thiazolidin-4-carbonsäure mit 0,1 n KOH bestimmt. Es konnte keine Alkylierung der SH-Gruppe festgestellt werden. Das Ergebnis wurde durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen bestätigt.

Diese Befunde schließen einen den β -Aminoketonen analogen Wirkungsmechanismus aus.

Aufgrund ihrer spezifisch gegen das Mammacarcinom gerichteten Wirkung ist für die 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene ein Wirkungsmechanismus zu diskutieren, wie er zur Zeit für die Therapie des Mammacarcinoms mit ablativen chirurgischen Methoden und mit hormonwirksamen Substanzen angenommen wird (48).

Nach Jensen und Jacobson (43) zeigen die "target"-Organe Mamma, Uterus, Vagina, Hypophyse und Mammacarcinom eine hohe Bindungsaffinität für Östrogene. Mammatumoren, die auf ablativ chirurgische Methoden nicht ansprechen, reichen Östrogene nicht an. Als Bindungsorte wurden ein nucleäres (5S) und ein zytoplasmatisches (9S) Protein erkannt. Die Bildung des Östrogen-Protein-Komplexes konnte durch Antiöstrogene kompetitiv gehemmt werden (45). Dem 5S-Protein wird eine Repressorfunktion zugeschrieben. Die physiologische Wirkung der Hormone soll nach Untersuchungen verschiedener Arbeitskreise (47) auf der Ebene der Transscription durch Aktivierung der DNA (Inaktivierung des 5S-Repressors durch Östrogen) erfolgen.

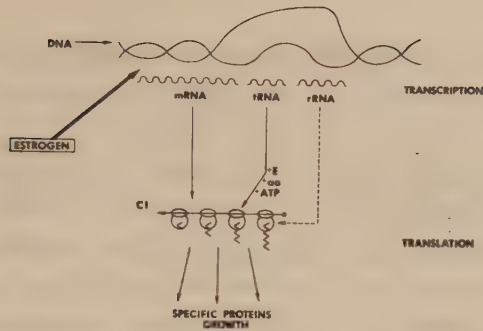


Abbildung: Molekularer Wirkungsmechanismus östrogenen Verbindungen (48)

Im Zusammenhang mit dieser Theorie wird die bei Versuchstieren beobachtete Stimulierung des Mammacarcinoms durch Östrogen mit der Synthese spezifischer für das Zellwachstum erforderlicher Proteine erklärt (44, 48). Dieser Vorgang führt zu einer Steigerung der Zahl aktiv proliferierender Zellen.

In Übereinstimmung damit stehen klinische Befunde: bei Patientinnen in der Prämenopause wird in etwa 30 % aller Fälle ein Rückgang des metastatisierenden Mammacarcinoms nach Oophorektomie beobachtet. Eine anschließende Behandlung solcher Fälle mit Östrogen führte vielfach zu einer erheblichen Verschlechterung (gesteigerte Osteolyse) (31).

Auch in der Organkultur konnte eine Stimulierung der Teilung von Mammacarcinom-Zellen durch Östrogen erreicht werden (44, 46).

Nach neueren Auffassungen (48) muß die Wirkung östrogenen und antiöstrogenen Verbindungen auf die Tumorentwicklung im Lichte der Zellkinetik gesehen werden (siehe nachfolgende Abb.).

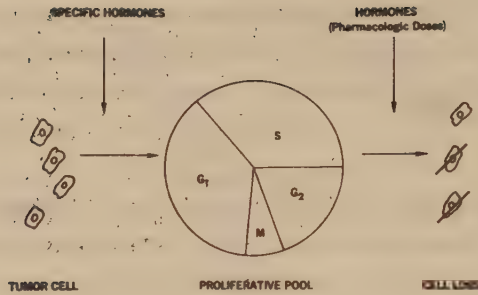


Abbildung: Beeinflussung des Wachstums von endokrinabhängigen Tumoren durch Hormone nach Lipsett (48)

Die Zellzykluszeit ist eine relativ stabile Größe. Sie beträgt für den Brustkrebs etwa zwei Tage; für die Verdoppelung der Tumorgröße sind beim Mammacarcinom bis zu 200 Tage erforderlich. Es wird angenommen, daß die Geschwindigkeit des Tumorwachstums von östrogenen und antiöstrogenen Verbindungen nicht durch eine Beeinflussung der Zellzykluszeit bestimmt wird, sondern daß diese durch eine Änderung der Zahl teilungsfähiger Zellen, die für einen Eintritt in den Proliferationspool in Frage kommen, wirken. Beispiele sind: eine verringerte Wachstumsstimulierung latenter Tumorzellen durch Östrogendefizit bei Adrenalectomie, Ovariectomie und Hypophysektomie; verringerte Wachstumsstimulierung durch Blockierung von Östrogenrezeptoren mittels Östrogenantimetaboliten; Verlust der Teilungskapazität durch Differenzierung von Tumorzellen nach physiologischen Hormondosen. Einfluß auf das Tumorwachstum kann weiterhin durch eine erhöhte Absterbegeschwindigkeit der Tumorzellen als Folge einer Hemmung von Stoffwechselprozessen bei Anwendung pharmakologischer Östrogendosen hervorgerufen werden.

Die oben erwähnte Beobachtung, daß Östrogenrezeptoren nur in wenigen Geweben ("target"-Gewebe) lokalisiert sind, bietet einmalige Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Chemotherapeutica, z. B. Einbau radioaktiver Isotope in Östrogene (ein solcher Versuch wurde mit ³²P Diäthylstilböstroldiphosphat (35) durchgeführt), Verknüpfung therapeutischer Wirkgruppen, wie N-Lost (81) mit Östrogenen.

Aufgrund unserer bisherigen Befunde wird für die 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene folgende Wirkungstheorie zur Diskussion gestellt:

3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene sind Östrogen-antagonisten. Die Bindung des körpereigenen Östrogens an Rezeptoren wird durch sie kompetitiv gehemmt. Einen Hinweis geben Versuche mit Verbindung I auf den Vaginalzyklus von Sprague-Dawley-Ratten. Während der Therapie des Mammacarcinoms war die Zahl der beobachteten Östren in einer Gruppe von 10 Tieren gegenüber 10 Kontrolltieren signifikant verringert (beobachteter Zeitraum: 3 Wochen).

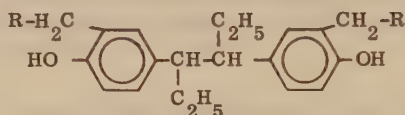
Versuche mit den heute zur Verfügung stehenden Hormonantagonisten, die in der Regel noch schwach östrogene Eigenschaften besitzen, haben gezeigt, daß es nicht möglich ist, die Östrogenwirkung komplett zu blockieren. Dadurch kommt es trotz anfänglichem Tumorrückgang zu einem erneuten Tumorwachstum. Die zeitlich begrenzten Erfolge nach Ovariectomie und Adrenalectomie werden mit der Aufnahme östrogenen Verbindungen durch die Nahrung und mit der Übernahme der Östrogenproduktion durch andere Drüsen erklärt.

Eine wichtige Aufgabe der Arzneimittelforschung ist die Auffindung rein anti-östrogenen Verbindungen mit größerer Rezeptoraffinität. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, die in unseren Untersuchungen gemacht wurde, von Interesse, daß sich die stark lipoidlöslichen Verbindungen II und IV gegenüber den weniger lipophilen Verbindungen durch eine gesteigerte Wirkung auszeichnen (Tab. 6). Anscheinend ist es möglich, durch Vergrößerung des Alkylaminrestes die Rezeptoraffinität zu erhöhen.

II. 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane

Die Auffindung von Verbindungen mit einer spezifischen Wirkung am Mammacarcinom der Ratte in der Klasse der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilbene veranlaßte uns, analoge Untersuchungen mit 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexanen durchzuführen.

Hierzu wurden folgende Verbindungen synthetisiert:



- | | | |
|------|---|---|
| V | $R : \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | 3,4-Bis-(3'-dimethylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan |
| VI | $R : \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$ | 3,4-Bis-(3'-diäthylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan |
| VII | $R : \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$ | 3,4-Bis-(3'-pyrrolidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan |
| VIII | $R : \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array} \text{CH}_2$ | 3,4-Bis-(3'-piperidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan |

Synthese

Die Herstellung der Verbindungen V-VIII erfolgte in Analogie zu der Synthese der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene (siehe Seite 6) durch Umsetzung von Hexöstrol, Paraformaldehyd und Amin im Molverhältnis 1:2:2 (Verfahren 1) oder durch Reaktion des Dinatriumsalzes von Hexöstrol mit Chlormethylamin im Molverhältnis 1:2 (Verfahren 2).

Die mit Hexöstrol und Stilböstrol erzielten Befunde sind vergleichbar. So war das Verfahren 1 auch bei Hexöstrol nur für die Herstellung des Dimethylamino-methyl-Derivates (Verbindung V) geeignet. Die Reaktion ist in siedendem Alkohol nach 60 Minuten beendet. Nebenprodukte konnten dünnenschichtchromatographisch nicht nachgewiesen werden.

Im Falle der Umsetzung von Hexöstrol mit Paraformaldehyd und Diäthylamin, Pyrrolidin oder Piperidin zu den Verbindungen VI, VII und VIII entstehen Nebenprodukte, deren Zahl mit der Reaktionsdauer zunimmt. Die Verbindungen VI-VIII lassen sich aber in relativ guten Ausbeuten (50 - 60 % der Theorie) und in weitgehend reiner Form nach Verfahren 2 herstellen.

Eine nähere Untersuchung der Nebenprodukte wurde im Falle der Verbindung VIII vorgenommen. Die Nebenprodukte lassen sich aufgrund der großen Unterschiede im Rf-Wert dünnenschichtchromatographisch gut erfassen. Durch Kristallisation konnte das in größeren Mengen anfallende Nebenprodukt (hRf 62) von 3,4-Bis-(3'-piperidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (VIII) (=A) abgetrennt und in reiner Form isoliert werden. Es wurde als 3-(4'-Hydroxy-phenyl)-4-(3'-piperidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (=B) identifiziert (Tab. 5, Abb. 5). Bei den anderen in geringer Menge vorliegenden Nebenprodukten, die wir nicht in reiner Form darstellen konnten, handelt es sich vermutlich um höher molekulare Kondensationsprodukte.

B wird bei der Umsetzung äquimolarer Mengen Hexöstrol, Paraformaldehyd und Piperidin in siedendem Alkohol (Verfahren 1) nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten als Hauptprodukt neben wenig A erhalten. Nach einer zusätzlichen Reaktionsdauer von 60 Minuten liegen beide Verbindungen (A und B) in annähernd gleichen Konzentrationen vor. Eine weitere Verlängerung der Reaktionsdauer führt zu nicht näher untersuchten Nebenprodukten (Abb. 5).

Im Gegensatz zu Verfahren 1 ist Verfahren 2 zur Herstellung einfach aminomethylierten Hexöstrols (B) weniger geeignet. Die Reaktion zwischen äquimolaren Mengen Hexöstrol und Chlormethyl-piperidin läuft in Acetonitril erst bei 50⁰ merklich ab. Es bilden sich schon nach 5 Minuten Reaktionszeit neben B erhebliche Mengen A. Nach 60 Minuten ist zum größten Teil A neben geringen Mengen B, Hexöstrol und anderen Nebenprodukten im Reaktionsgemisch enthalten.

Tabelle 7:

hRf-Werte der 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane
 Trägerschicht: Kieselgel GF254
 Fließmittel: Chloroform/Cyclohexan/Methanol
 NH₃ gesätt. Chloroform (50:40:10:10 Vol. Tle)

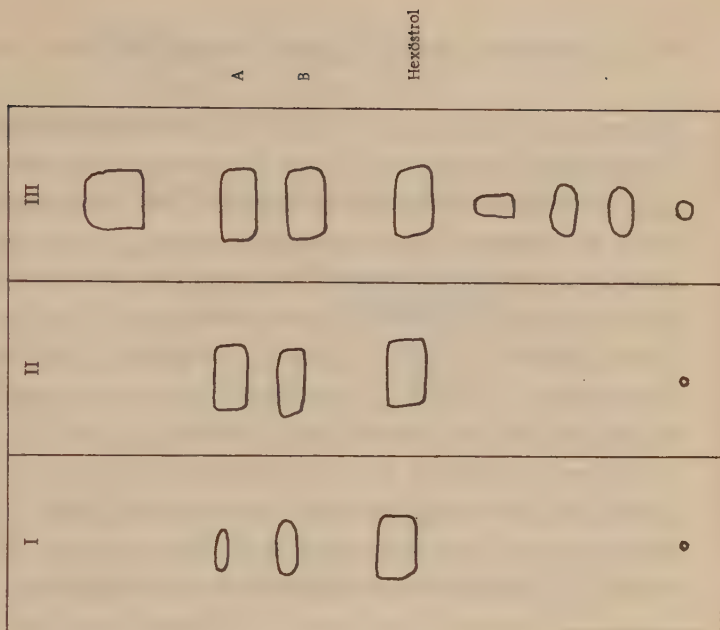
	Verbindung	hRf
V	$ \begin{array}{c} \text{R}_1 \quad \text{C}_2\text{H}_5 \\ \quad \\ \text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OH} \\ \quad \\ \text{C}_2\text{H}_5 \quad \text{R}_2 \end{array} $	42
VI	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{R}_1\text{R}_2 : \text{CH}_2 - \text{N} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \end{array} $	58
VII	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \\ \text{R}_1\text{R}_2 : \text{CH}_2 - \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \end{array} $	32
VIII	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \\ \text{R}_1\text{R}_2 : \text{CH}_2 - \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{array} $	78
	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \\ \text{R}_1 : \text{H} \quad \text{R}_2 : \text{CH}_2 - \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{array} $	62

Abbildung 5:

Umsetzung von Hexöstrol mit Paraformaldehyd
 und Piperidin (Verfahren 1)

I : n. 30 Min.; II: n. 180 Min.; III: n. 10 Std.

Chromatogramm (näheres s. Tab. 7 und exp. Teil)



Untersuchungen über die tumorhemmende Wirkung

Die Prüfung der Verbindungen V-VIII auf tumorhemmende Wirkung erfolgte am Yoshida-Sarkom der Ratte, am Sarkom 180 der Maus und am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Sprague-Dawley-Ratte. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen 9-12 zusammengefaßt. Die $DL_{50(1)}$ liegt bei der Ratte zwischen 150 und 400 mg/kg; toxische Dosen rufen tonisch-klonische Krämpfe hervor. An den beiden Impftumoren sind die Verbindungen V-VIII, wie die entsprechenden Stilböstrol-Derivate, unwirksam. Am Benzidin-induzierten Mammacarcinom sind die 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane wirksam. Sie unterscheiden sich jedoch bezüglich ihrer Wirkungsintensität von den Stilböstrol-Analogen erheblich. Alle aminomethylierten Hexöstrole (V-VIII) bewirken lediglich eine Verzögerung des Tumorwachstums im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. In keinem Fall ist ein Wachstumsstillstand, wie er mit den Stilböstrol-Derivaten II und IV beobachtet wurde, zu verzeichnen.

Wirkungsmechanistische Betrachtungen

Das Reaktionsverhalten der 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane unter physiologischen Bedingungen entspricht dem der Stilböstrol-Analogen. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen, die an Verbindung V vorgenommen wurden, zeigen, daß innerhalb von 24 Stunden bei pH 7, 35 und 37° keine Zersetzungsprodukte gebildet werden. Eine Reaktion mit Cystein als nucleophiler biologischer Modellsubstanz konnte im Dünnschichtchromatogramm ebenfalls nicht festgestellt werden.

Das Diäthylamino-methyl- (VI) und das Piperidino-methyl-Derivat (VIII) des Hexöstrols zeichnen sich, wie die entsprechenden Stilböstrol-Verbindungen, durch ausgeprägte lipophile Eigenschaften aus (Tab. 8). Eine erhöhte Wirkung, wie bei den Verbindungen II und IV, ist damit jedoch nicht verbunden.

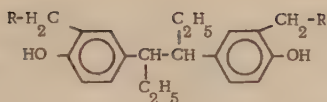


Tabelle 9: Prüfung der akuten Toxizität an Ratte und Maus

	DL ₅₀₍₁₎ in mg/kg		Zubereitungsform der Dihydroxychloride
	Ratte	Maus	
$R: N \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	195	185	5% wäßr. Susp.
$R: N \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	195	150	"
$R: N \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	150	90	"
$R: N \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	400	350	"

Tabelle 10: Prüfung am Yoshida-Sarkom der Ratte

	Gesamtdosis		Tierzahl		Tumorgew. ¹⁾		Mittl. Lebensdauer in Tg ¹⁾		Wachstumshemmung in % ¹⁾
	mg/kg	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	
$R: N \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	300	5	5	7	5,2	7,7	28,2	23,4	32
$R: N \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	300	5	5	7	6,1	7,7	25,4	23,4	21
$R: N \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	150	5	5	7	5,7	7,7	23,6	23,4	26
$R: N \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	300	5	5	7	7,5	7,7	19,2	23,4	-

1) nähere Angaben siehe Seite 15

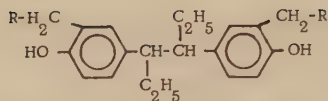


Tabelle 11: Prüfung am Sarkom 180 der Maus

	Gesamtdosis		Tierzahl		Tumorgewicht ¹⁾		Wachstums- hemmung in % 1)	Signifikanz ¹⁾
	mg/kg	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
$R: N \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	200	8	17	19	0,87	1,16	22	-
$R: N \begin{matrix} \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \end{matrix}$	200	8	19	19	0,83	1,16	26	-
$R: N \begin{matrix} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{matrix}$	120	8	16	19	0,89	1,16	21	-
$R: N \begin{matrix} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{matrix}$	400	8	19	19	1,2	1,16	-	-

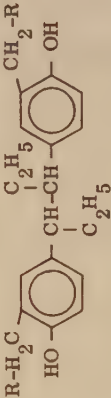
Tabelle 12: Prüfung am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte

	Gesamtdosis		Tumorstadiums- hemmung ¹⁾
	mg/kg	verteilt auf Tage	
$R: N \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	2.560	32	(+)
$R: N \begin{matrix} \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \end{matrix}$	4.500	15	(+)
$R: N \begin{matrix} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{matrix}$	1.680	42	(+)
$R: N \begin{matrix} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{matrix}$	9.000	18	(+)

1) nähere Angaben siehe Seite 15 und 16

Die fehlende Reaktivität der 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane unter physiologischen Bedingungen und die spezifische, wenn auch geringe Wirkung am Mammacarcinom deuten auf einen Wirkungsmechanismus hin, wie wir ihn für die 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene diskutieren (siehe Seite 19). Die starken Wirkungsunterschiede zwischen beiden Verbindungsklassen zeigen die Bedeutung der -C=C- -Doppelbindung für das Wirkgeschehen.

Tabelle 8: Physikalisch-chemische Eigenschaften der 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane

				
	$\text{R} : \text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	$\text{R} : \text{N} \begin{matrix} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{matrix}$	$\text{R} : \text{N} \begin{matrix} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{matrix}$	$\text{R} : \text{N} \begin{matrix} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{matrix}$
Verteilungskoeffizient K (Ligroin/Methanol/Phosphatpuffer pH 7,35)	5,0	27,0	8,45	24,5
Trübungs-pH (0,1 Mol/l, 20°)	6,0	5,8	6,9	6,3
Wasserlöslichkeit der Base (mmol/l, 20°)	0,019	0,047	0,057	0,074
Gesamtlöslichkeit der Substanz (mmol/l, 20°, pH 7,35)	3,33	2,16	24,8	1,3
p'K _a -Wert (H ₂ O)	9,75	9,0	9,5	8,1
Prozentanteil protonisierte Base bei pH 7,35	99,4	97,8	99,8	94,4

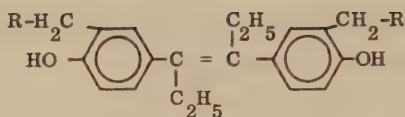
III. Die coronardilatierende Wirkung der aminomethylierten Stilböstrole und Hexöstrole

Neben der Prüfung der aminomethylierten Stilböstrole und Hexöstrole auf carcinostatische Eigenschaften war die Frage nach der coronardilatierenden Wirkung dieser Verbindungen von Interesse.

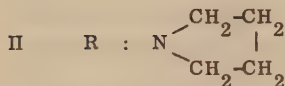
Es ist bekannt, daß mit Östrogenen und Androgenen günstige klinische Erfolge bei der Behandlung von Angina pectoris, Myocardinfarkten und Koronarsklerosen erzielt werden (36, 37, 38, 55). Eine Behandlung mit Keimdrüsenhormonen ist jedoch wegen der geschlechtsspezifischen Wirkung (Potenzstörungen, uterine Blutungen) auf die Dauer nicht möglich. Cavallini und Massarani (39) konnten in 4,4'-Diäthylamino-äthoxy-hexöstrol (Trimanyl^R) einen Coronardilatator vom Hexöstroltyp auffinden, der keine nennenswerten östrogenen Nebenwirkungen mehr aufweist. Mit dieser Verbindung stellten Grumelli und Milla (40) am isolierten Kaninchenherzen nach Langendorff eine Steigerung der Durchblutung des Herzens fest, die der des Adenosins entspricht. Die analoge Stilböstrol-Verbindung zeigte erst mit der zwei- bis dreifachen Dosis die gleiche Wirkung. Die blutdrucksenkende Wirkung blieb in beiden Fällen gering.

Diese Befunde veranlaßten uns, die von uns hergestellten aminomethylierten Stilböstrole und Hexöstrole am isolierten Meerschweinchenherzen nach Langendorff zu testen.

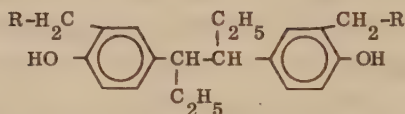
Hierzu setzten wir folgende Verbindungen ein:



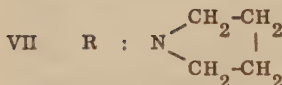
3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben



3,3'-Bis-(pyrrolidino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben



3,4-Bis-(3'-dimethylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan



3,4-Bis-(3'-pyrrolidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan

Wie aus den Abbildungen 6 und 6 a hervorgeht, besitzen diese Verbindungen am isolierten Meerschweinchenherzen einen negativ inotropen Effekt. Mit einer Dosis von jeweils 200 μ kommt es dabei zu einer Abnahme auf ein Drittel (Verb. I und III) bzw. auf ein Viertel (Verb. V und VII) der ursprünglichen Kontraktionshöhe. Gleichzeitig wird jedoch die coronare Durchflußgeschwindigkeit mit beiden Verbindungstypen verdoppelt.

Ein quantitativer Vergleich macht die unterschiedliche Haftfestigkeit deutlich. So erholt sich das Meerschweinchenherz von der negativ inotropen Wirkung der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilbene bereits nach 10 Minu-

ten, während die Hemmwirkung der entsprechenden Hexöstrol-Verbindungen auf die Kontraktionskraft des Herzens über 1 Stunde anhält. Analog dazu dauert der erhöhte Coronardurchfluß bei den Hexöstrol-Verbindungen doppelt so lange (ca. 10 Minuten) als bei den Stilböstrol-Verbindungen. Im letzteren Fall folgt der gesteigerten Durchflußgeschwindigkeit eine geringfügige Abnahme.

Die Anforderungen, die an einen Coronardilatator gestellt werden (z. B. fehlende Beeinflussung der Kontraktionskraft, fehlende Frequenzsteigerung, stabiler Blutdruck), werden durch die aminomethylierten Stilböstrole und Hexöstrole nicht erfüllt.

(I)

(IV)

K

T



Abbildung 6: 3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (I) = StDim und 3,3'-Bis-(pyrrolidino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (IV) = StPy am Langendorff-Herzen
Dosis: 200 μ

K = Kontraktionshöhe der Ventrikel (Übersetzung 1:5)

T = Tropfenzahl/Minute

(VI)



(VII)

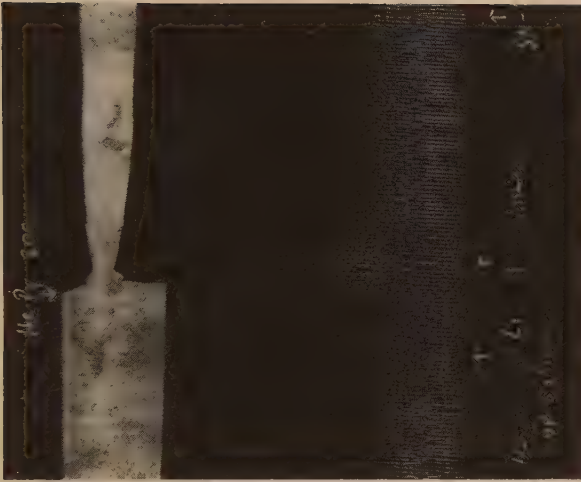
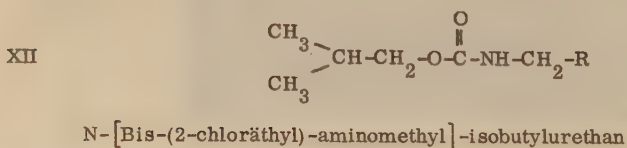
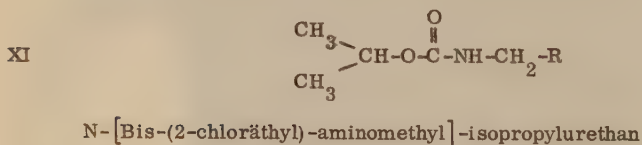
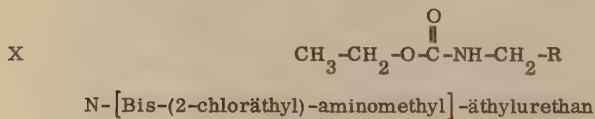
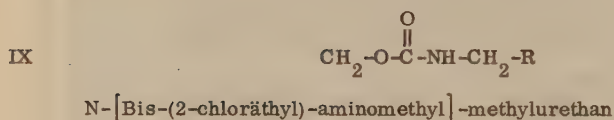
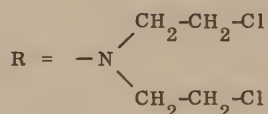
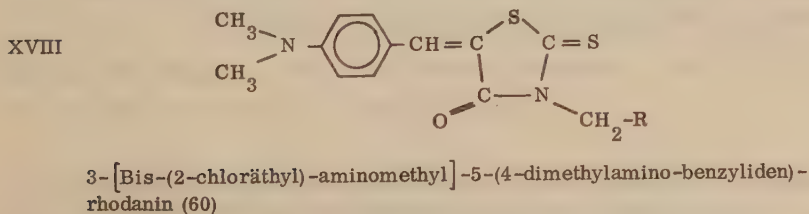
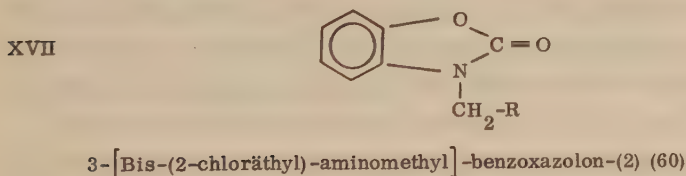
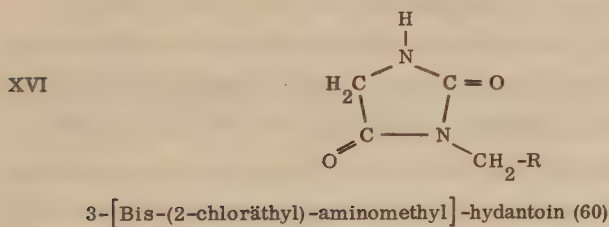
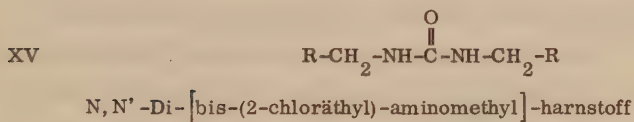
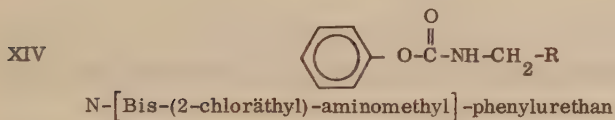
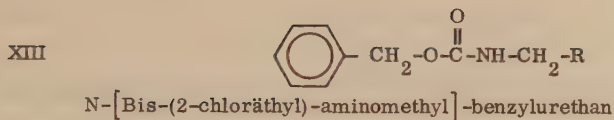


Abbildung 6 a: 3, 4-Bis-(3'-dimethylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (V) = HeDim und 3, 4-Bis-(3'-pyrrolidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (VII) = HePy am Langendorff-Herzen
Dosis: 200 μ

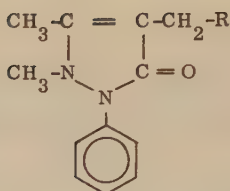
C. Tumorhemmende acylierte N-Lost-Aminale

Im Rahmen unserer Untersuchungen über tumorhemmende C- und N-Mannich-Basen wurden weiterhin 6 N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane (IX-XIV) und N,N-Di-[bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-harnstoff (XV) synthetisiert und vergleichend mit bekannten N-Lost-Mannich-Basen (XVI-XIX) (60, 61) auf ihre Wirkung geprüft.





XIX



4-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-1-phenyl-2,3-dimethylpyrozolon (61)

In der Literatur sind eine Reihe von N-Mannich-Basen des Nor-Losts beschrieben, die sich von imidartigen Strukturen oder von Heterocyclen, wie Carbazol und Isatin, ableiten (60, 64, 65). Keine dieser Verbindungen zeichnet sich durch überdurchschnittliche, den therapeutisch verwendeten Lost-Verbindungen vergleichbare Eigenschaften aus. In Untersuchungen unseres Arbeitskreises wurde neuerdings gezeigt, daß N-Mannich-Basen des Nor-Losts vom Typ der N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamide ausgeprägte tumorhemmende Eigenschaften besitzen (52). Dabei waren einige Vertreter in ihrer Wirkung am Yoshida-Sarkom der Ratte und am Sarkom 180 der Maus dem Nor-Lost und dem N-Methyl-Lost merklich überlegen.

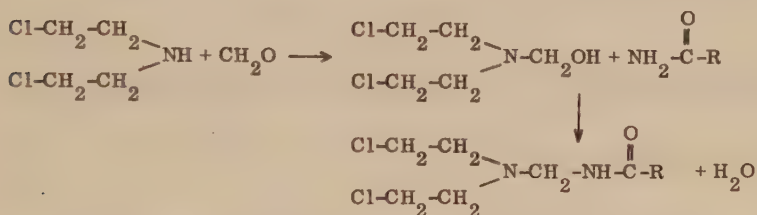
Die im vorliegenden Kapitel beschriebenen Versuche mit N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethanen und N, N'-Di-[bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-harnstoff schließen sich an diese Untersuchungen an. Die Problemstellung, die unseren Studien zugrundeliegt, ist in der Dissertation von Bindl (52) ausführlich dargelegt. Danach sind acylierte N-Lost-Aminale zur Aminoäthylierung und zur Amidomethylierung biologischer Substrate befähigt. Dieser Vorgang ist bei N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethanen mit einer Freisetzung der Urethane⁺ verbunden, die selbst tumorhemmende Eigenschaften aufweisen.

+ Aus der großen Zahl der untersuchten Urethane zeigt Äthylurethan die größte tumorhemmende Wirkung (62, 63, 68).

Synthese

Aminale aus Nor-Lost, Formaldehyd und Urethanen oder Harnstoff sind in der Literatur nicht beschrieben.

Die Darstellung erfolgt durch Mannich-Reaktion von Nor-Lost mit Urethanen bzw. Harnstoff über Hydroxymethyl-bis-(2-chloräthyl)-amin (siehe dazu 60):



Hierzu wird zunächst die Nor-Lost-Base aus dem Hydrochlorid freigesetzt. Dabei soll die Temperatur von 5° möglichst nicht überschritten werden, da Bis-(2-chloräthyl)-amin leicht zur Selbstkondensation unter Bildung von cyclischen Piperazinium-Dimeren neigt (69, 92). Die vom Lösungsmittel befreite Nor-Lost-Base wird unter Eiskühlung durch portionsweise Zugabe äquimolarer Mengen Formaldehyd (wässrige Lösung) hydroxymethyliert. Das entstandene Hydroxymethyl-bis-(2-chloräthyl)-amin wird in Äthanol gelöst und mit der NH-aciden Komponente unter Kühlen kondensiert.

Für einen glatten Ablauf der Mannich-Reaktion ist die Löslichkeit der NH-aciden Komponente von Wichtigkeit. So konnten beispielsweise die schlecht äthanollöslichen Stoffe Biuret, Dicyandiamid und N-Hydroxymethyl-harnstoff, die mit anderen Basen wie Morpholin nach Mannich reagieren (siehe Kap. D, Seite 100), mit Nor-Lost-Base nicht zur Reaktion gebracht werden.

Die äthanollöslichen Urethane und der in Äthanol ebenfalls gut lösliche Harnstoff setzen sich unter diesen Reaktionsbedingungen jedoch sehr leicht um. Das Harn-

stoffkondensat kristallisiert bereits nach 10 Minuten aus der äthanolischen Lösung des Ansatzes aus, während die Urethan-Lost-Kondensate (IX-XIII) nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum in Form von Ölen zurückbleiben. Die Umsetzungsprodukte mit Methylurethan (IX), Äthylurethan (X) und Phenylurethan (XIV) sind aus Äthanol/Wasser kristallin zu erhalten. Die Verbindungen XI-XIII, die durch präparative dünnschichtchromatographische Trennung in analytisch reiner Form erhalten werden, sind nicht kristallin. Die Darstellung der Hydrochloride ist nicht möglich, da Zersetzung eintritt (näheres siehe experimenteller Teil).

Untersuchungen über die tumorhemmende Wirkung

1. Toxizität

Die neuen Verbindungen besitzen eine höhere Toxizität als Nor-Lost, sie sind jedoch besser verträglich als N-Methyl-Lost. Diese Eigenschaften sind mit der Reaktivität (Aminoäthylierung) der N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane, die zwischen Nor-Lost und N-Methyl-Lost liegt, eng verknüpft. Sie werden weiterhin vom Verteilungsverhalten der einzelnen Verbindungen bestimmt (Bindungen unspezifischer Rezeptoren über hydrophobe Bindungskräfte); jedoch sind diese Zusammenhänge nicht so klar überschaubar, wie im Falle der N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamide (52). Die erhöhte Toxizität gegenüber Nor-Lost ist als Hinweis zu werten, daß die N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane ihre tumorhemmende Wirkung nicht durch eine Freisetzung von Nor-Lost entfalten. Ein solcher Vorgang müßte sich eher in einer Verringerung der Toxizität bemerkbar machen.

Tabelle 12: Toxizität der N-Lost-Derivate bei einmaliger im. bzw. ip. Applikation an Ratte und Maus

Substanz	DL ₅₀ (1) mg/kg		Zubereitungsform
	Ratte im.	Maus ip.	
IX	11	23	50 % DMSO/Wasser ⁺⁺
X	26	57	"
XI	20	40	"
XII	20	50	"
XIII	40	50	DMSO
XIV	55	60	"
XV	14	37	"
XVI	23	60	"
XVII	8	42	"
XVIII	15	65	"
XIX ⁺	30	30	Wasser
Nor-Lost ⁺	160	280 (52)	"
N-Methyl-Lost ⁺	1, 1	2, 75 (52)	"

+ eingesetzt als Hydrochlorid
++ Lösungsmittel

2. Prüfung am Yoshida-Sarkom der Ratte

Alle N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane (IX-XIV) zeigen am Yoshida-Sarkom eine ausgeprägte Wachstumshemmung (93 - 100 %). Bei den aromatischen Verbindungen XIII und XIV lag unter den Versuchsbedingungen die Heilungsrate bei 100 %, mit den aliphatischen Verbindungen IX-XII konnten 30 - 70 % der Tiere geheilt werden. Diese Unterschiede zwischen aliphatischen und aromatischen Urethan-Losten werden besonders deutlich beim Vergleich der Wachstumskurven. Wie aus den Abbildungen 7 - 15 zu ersehen ist, rufen die aliphatischen Verbindungen zwar einen nahezu vollständigen Tumorrückgang hervor; nach Beendigung der Therapie tritt jedoch erneut ein starkes Tumorwachstum auf, das durch weitere Applikation nur bei einem Teil der Tiere gestoppt werden konnte. Die besten therapeutischen Erfolge wurden bei der Applikation der Verbindungen IX-XIV an 10 aufeinander folgenden Tagen erreicht.

Die Spitzenstellung der aromatischen N-Lost-Verbindungen wird besonders deutlich, wenn man berücksichtigt, daß bereits mit 54 % der $DL_{50(1)}$ von XIV (verteilt auf 10 Tage) eine 100 %ige Heilung zu erzielen ist. Mit vergleichbaren Dosen der aliphatischen N-Lost-Verbindungen lassen sich nur bedeutend geringere Werte erreichen. Die aromatischen Verbindungen XIII und XIV übertreffen in ihrer Wirkung sogar N-Methyl-Lost, das mit 50 % der $DL_{50(1)}$ eine Heilquote von 33 % und mit 63 % der $DL_{50(1)}$ eine solche von 75 % aufweist. Eine genauere vergleichende Untersuchung mit Bestimmung der ED_{50} und der therapeutischen Breite wäre hier von großem Interesse.

Bemerkenswert ist weiterhin die Überlegenheit von XIV gegenüber XIII. XIV ist stärker tumorhemmend und besser verträglich. Bei einer Dosis von 62 % der $DL_{50(1)}$, verteilt auf 10 Tage, bewirkte XIII eine 100 %ige Heilung der Tiere, während eine Dosis von 75 % der $DL_{50(1)}$, verteilt auf 5 Tage, zum Tod der Tiere durch Überdosierung führte. XIV dagegen verursachte nach 54 % der $DL_{50(1)}$ (verteilt auf 10 Tage) und nach 64 % der $DL_{50(1)}$ (verteilt auf 5 Tage) keinerlei schädigende Wirkung, die Tiere wurden alle geheilt (Tab. 13).

Um zu einer genaueren Bewertung der hervorstechenden Verbindungen XIII und XIV zu kommen, ist die Prüfung mit niedrigen Dosen erforderlich. Diese Untersuchungen, die zur Erstellung von exakten Dosis-Wirkungskurven führen und einen Vergleich mit therapeutisch gebräuchlichen Alkylantien gestatten, sind zur Zeit im Gange.

Zur Klärung der Frage, ob die tumorhemmende Wirkung der N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane über eine Freisetzung von Nor-Lost erfolgt, wurde vergleichend Verbindung X und eine äquimolare Menge Nor-Lost getestet. Nor-Lost war in diesen Konzentrationen unwirksam. Ebensowenig ist bei der niederen Dosierung von X die Eigenwirkung der latenten Urethanmenge für die Wirkung von Bedeutung (siehe Seite 102). Die Verbindung X ruft dagegen eine Wachstumshemmung von 97 % hervor (Tab. 13).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß die N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane, ebenso wie die N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamide (52), ihre tumorhemmende Wirkung vorwiegend als Gesamtmolekül entfalten.

Im Gegensatz zu den N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethanen ist die Wirkung der Harnstoff-Verbindungen XV und der zu Vergleichszwecken herangezogenen Verbindungen XVI-XIX gering. Heilungen waren, wenn überhaupt, nur unter Verwendung extrem hoher Dosen möglich (z. B. 150 bzw. 175 % der $DL_{50(1)}$ bei Verbindung XVII).

Tabelle 13: Prüfung der N-Lost-Derivate am soliden Yoshida-Sarkom der Ratte

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumor- gewicht		Überlebende nach 7 Tg.		Mittl. Lebens- dauer in Tg.		Überlebende nach 90 Tg.		Geheilt in %	Wachstums- hemmung in %
	mg/kg	% DL	50(1) auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers./von	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.		
IX	8	72,5	10	6	9	0,2	11,7	6 / 6	51,5	18,3	3	-	30	100	
X	10	38,5	1	5	6	0,1	9,9	2 / 5	22,6	22,2	-	-	-	99	
	10,5	40,5	10	7	6	0,4	13,0	7 / 7	71,5	18,5	5	-	75	97	
	12	45,0	10	7	9	0,18	11,7	7 / 7	55,7	18,3	3	-	43	100	
XI	14	70,0	10	7	6	0,4	6,13	7 / 7	66,0	26,8	4	-	57	94	
XII	14	70,0	10	7	6	0,3	6,13	7 / 7	73,6	26,8	5	-	71	95	
XIII	30	75,0	5	7	6	0,13	6,13	0 / 7	23,0	26,8	-	-	-	98	
	25	62,5	10	9	7	0,38	10,4	9 / 9	90,0	18,4	9	2	100	100	
XIV	35	64,0	5	7	6	0,04	6,13	7 / 7	90,0	26,8	7	-	100	100	
	30	54,5	10	8	7	0,0	10,4	8 / 8	90,0	18,4	8	-	100	100	
XV	10	71,5	10	7	6	1,8	6,13	7 / 7	30,6	26,8	-	-	-	71	

Tabelle 13 (Fortsetzung):

Prüfung der N-Lost-Derivate am soliden Yoshida-Sarkom der Ratte

Substanz Nr.	Gesamtdosis		Tierzahl		Tumor- gewicht		Überlebende nach 7 Tg.		Mittl. Lebens- dauer in Tg.		Überlebende nach 90 Tg.		Geheilt in %	Wachstums- hemmung in %
	mg/kg % DL ₅₀ (1)	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers./von		Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
XVI	12	52,0	10	6	6	2,1	13,0	6 / 6	28,6	18,5	-	-	-	84
	12	150,0	10	7	6	0,3	13,0	7 / 7	62,7	18,5	4	-	65	97
XVII	14	175,0	10	6	9	0,75	11,7	6 / 6	37,2	18,3	1	-	17	94
	14	93,0	10	6	6	0,8	13,0	6 / 6	21,6	18,5	-	-	-	94
XVIII	14	93,0	10	6	9	2,3	11,7	6 / 6	25,7	18,6	-	-	-	80
	12	40,0	4	6	6	1,8	13,0	6 / 6	46,4	18,5	-	-	-	86
XIX	24	80,0	8	6	6	1,7	9,1	6 / 6	54,2	28,5	2	-	30	81
	18	60,0	10	7	6	2,0	6,13	7 / 7	49,0	26,8	2	-	28	68
Nor- ++ Lost	6		10	6	6	12,4	13,0	6 / 6	20,2	18,5	-	-	-	-

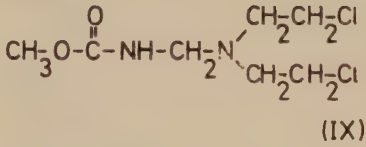
+ nähere Angaben siehe Seite 15
++ als Base appliziert

Abb. 7

Dosis in mg/kg geheilt/von

---- 8 / 10 Tage 2 6

— Kontrolle 0 6



Tumorgewichtung

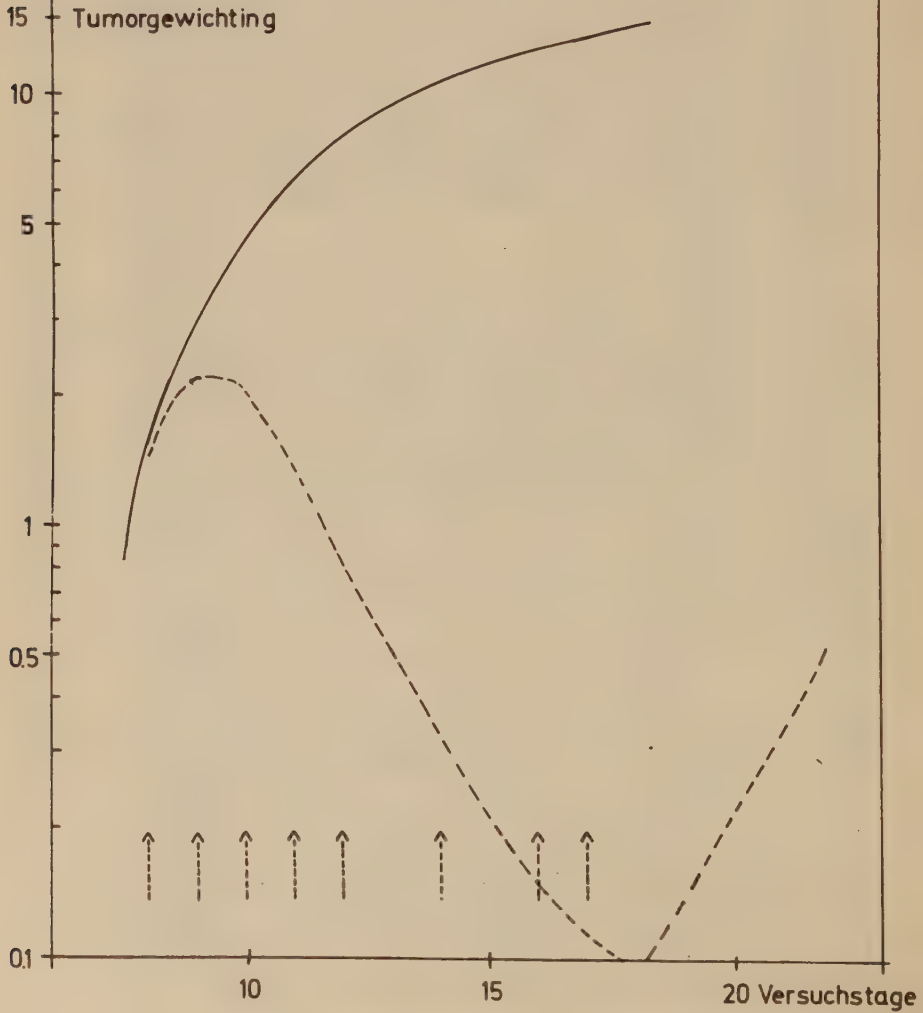
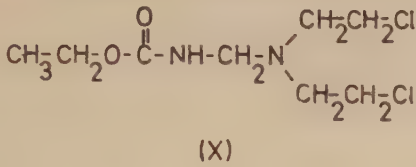


Abb. 8



Dosis in mg/kg geheilt/von

--- 10/1 Tag	0	5
- - - 105/10 Tage	5	7
..... 12/10 "	3	7
— Kontrollen		

Tumorgewicht in g

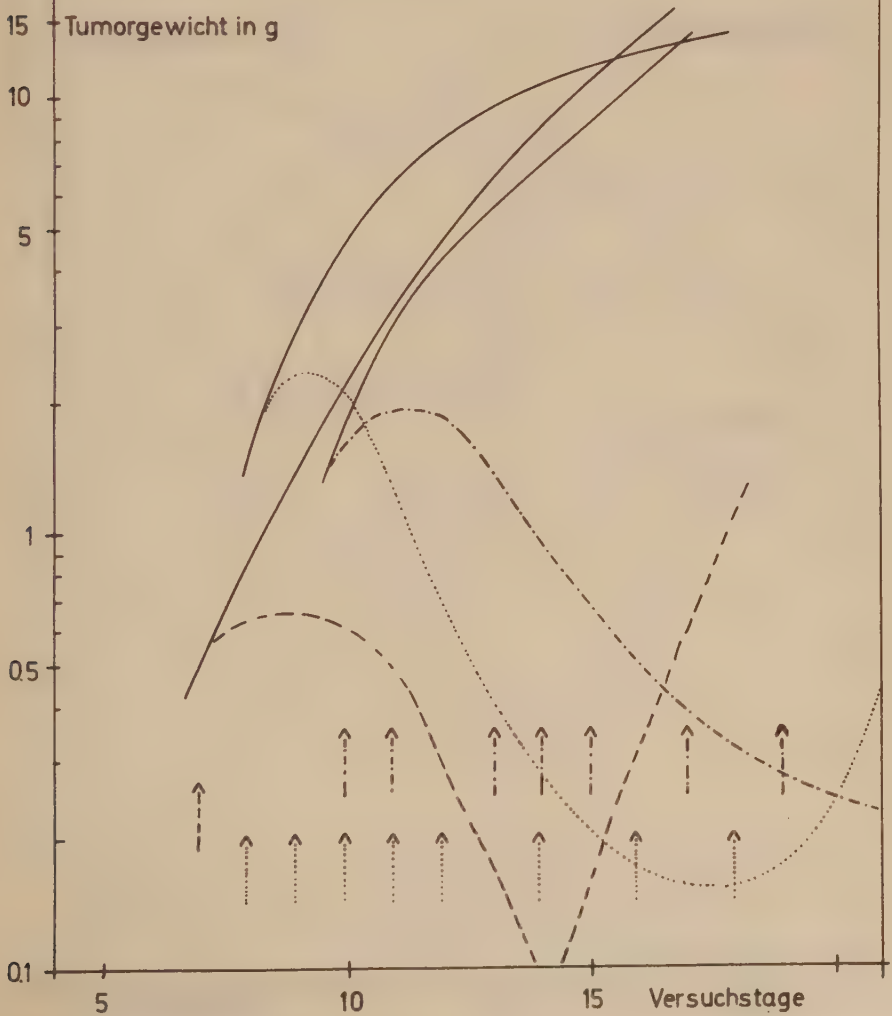


Abb. 9

Dosis in mg/kg geheilt / von

----	XI	14/10 Tage	4	7
----	XII	14/10 "	5	7
—	Kontrolle		0	6

Tumorgewicht in g

15

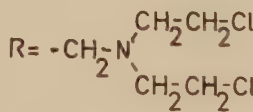
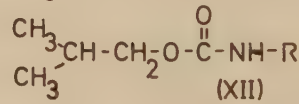
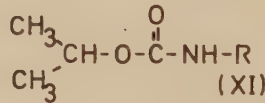
10

5

1

0.5

0.1



10

15

20 Versuchstage

Abb. 10

Dosis in mg/kg geheilt/von

XIV	----	30/10 · Tage	8	8
XIII	-·-·-	15/10 "	9	9
	—	Kontrollen	0	7

Tumorgewicht in g

15

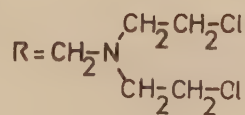
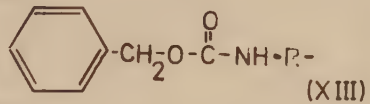
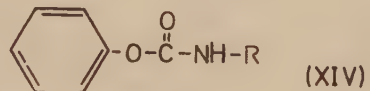
10

5

1

0.5

0.1



15

20

25

Versuchstage

Abb. 11

Dosis in mg/kg geheilt/von

-----	XVI 35/5 Tage	7	7
- - - -	XIII 30/5 "	0	7
—	Kontrolle	0	7

Tumorgewicht in g

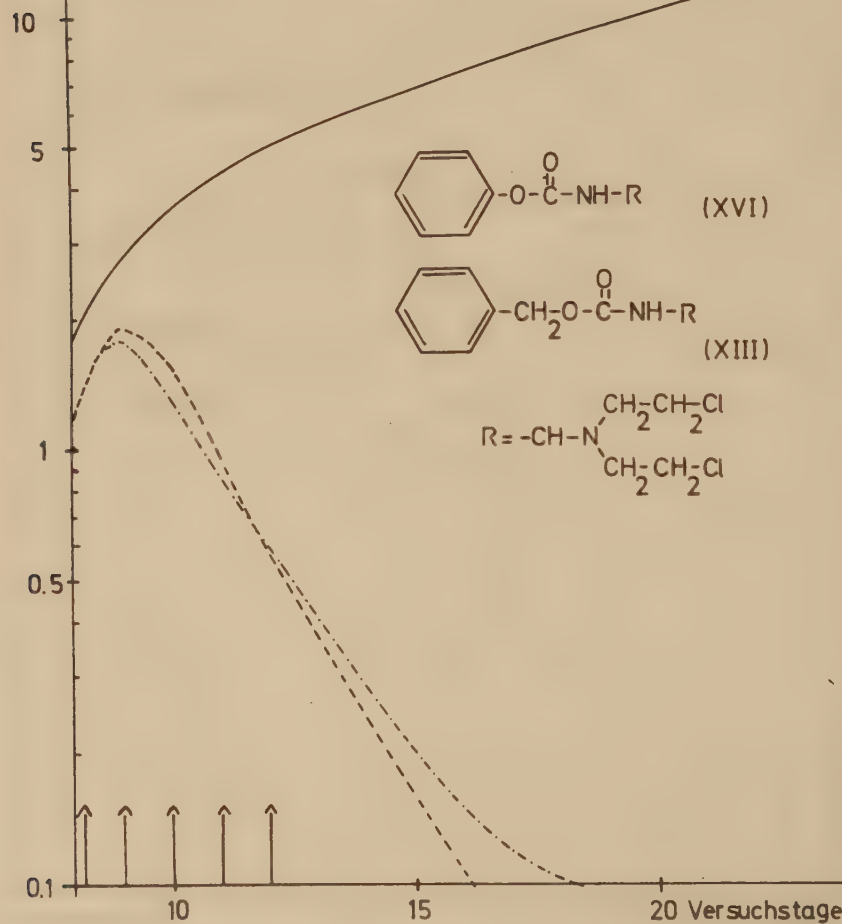


Abb. 12

Dosis in mg/kg	geheilt / von	
--- XV 10/10 Tage	0	7
- - - XVI 12/ 10 "	0	6
Kontrollen	0	6

Tumorgewicht in g

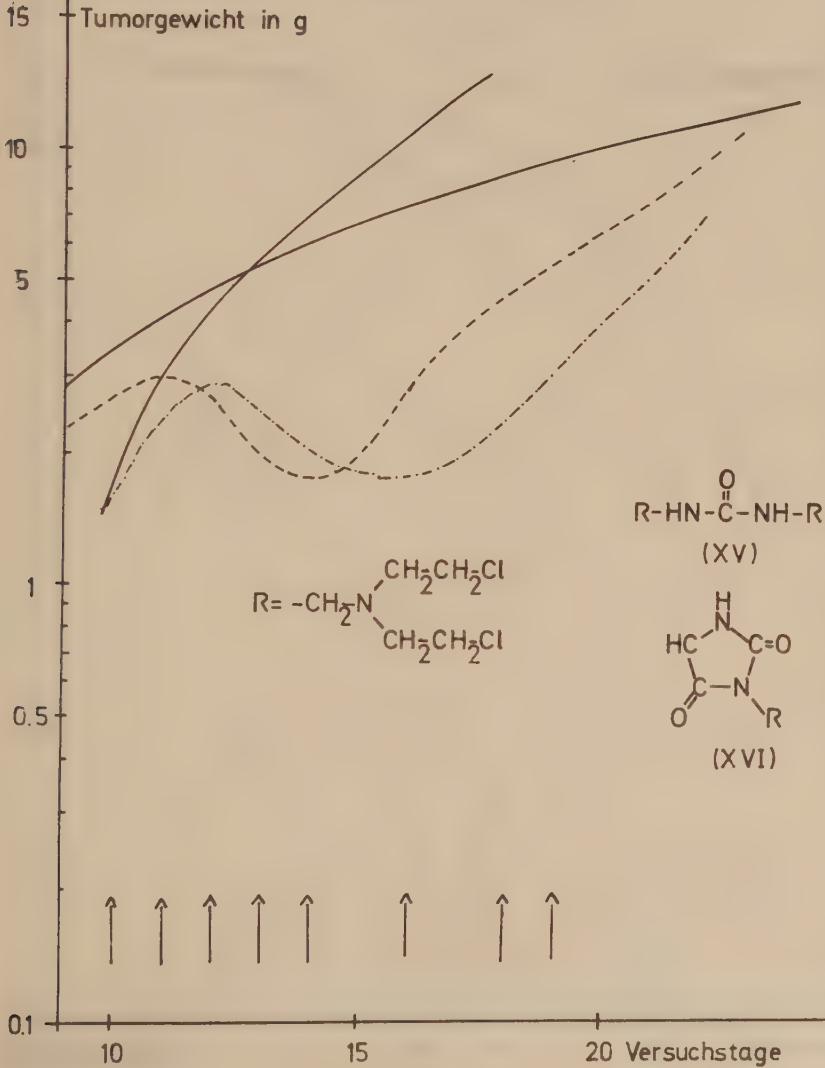
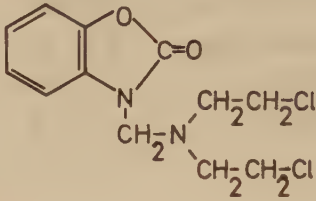


Abb. 13



Dosis in mg/kg geheilt/von

----- 12/10Tage 4 7

- - - - 14/10 " 1 6

— Kontrollen

(XVI)

Tumorgewicht in g

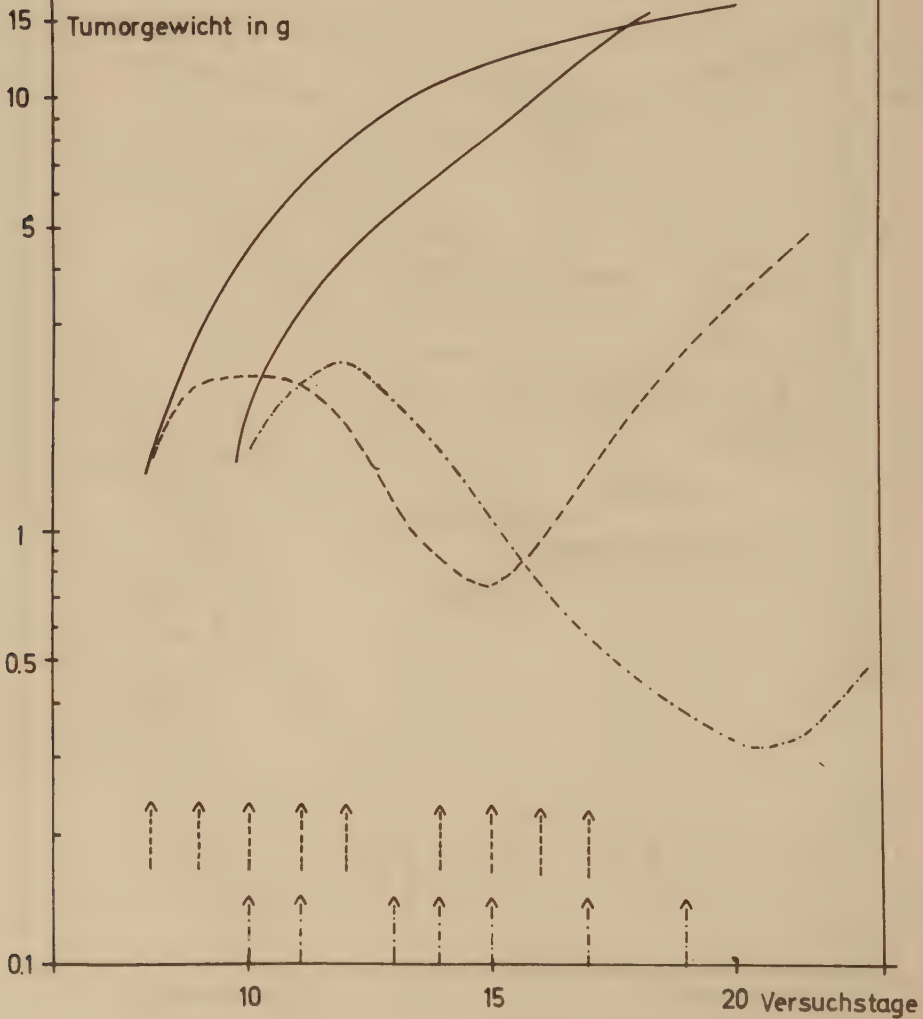


Abb. 14

Dosis in mg/kg geheilt/von

--- 14/10 Tage 1 6

--- 14/10 " 0 6

— Kontrolle

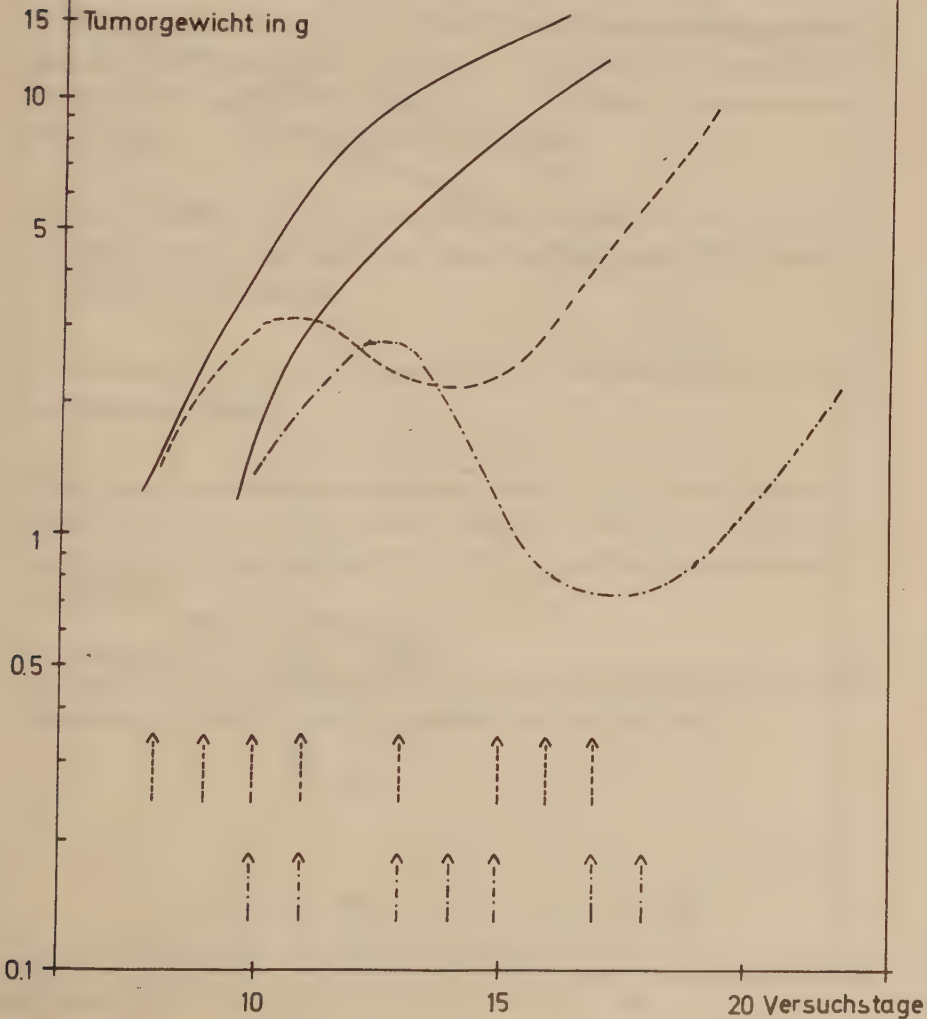
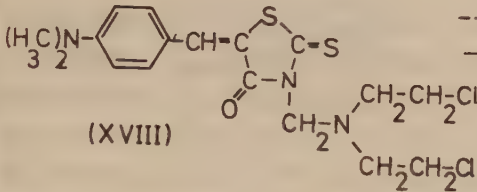
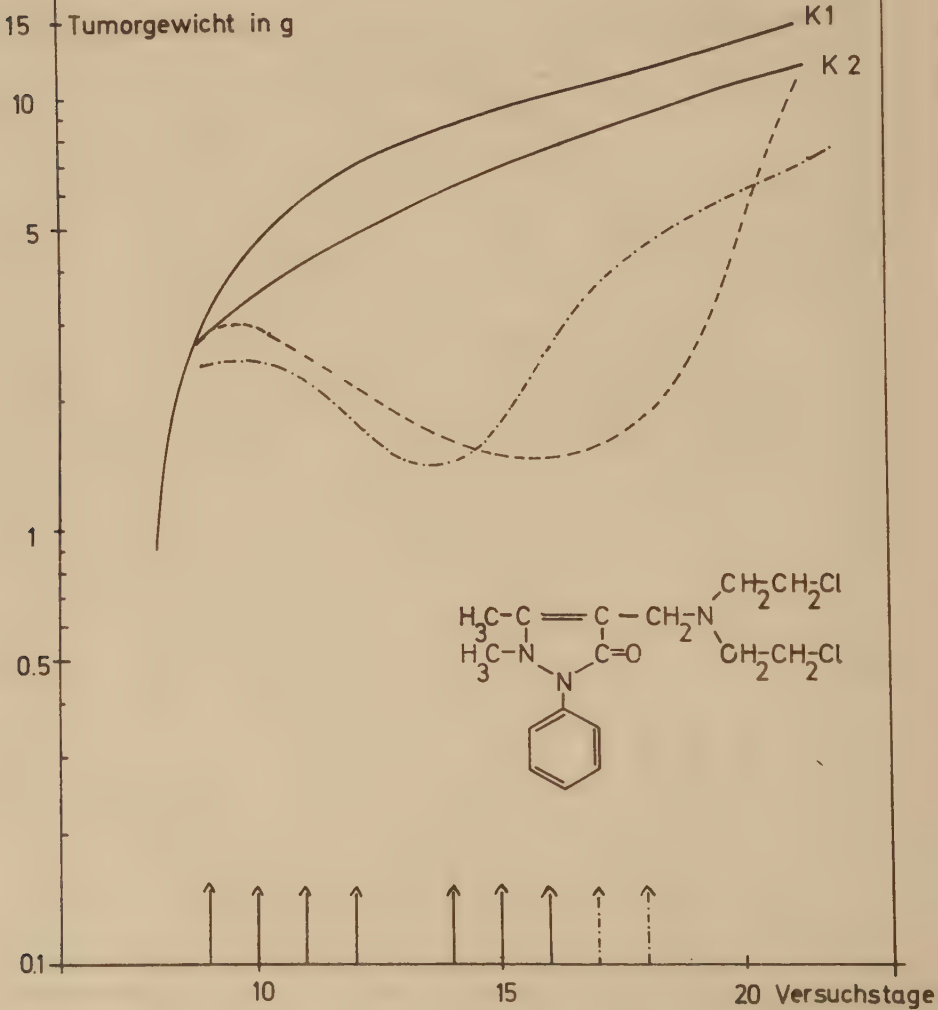


Abb. 15

Dosis in mg/kg geheilt/von

--- XIX 24/8 Tage	2	6
Kontrolle K 1	0	6
- - - XIX 18/10 Tage	2	7
Kontrolle K 2	0	6



3. Prüfung am Sarkom 180 der Maus

Die Befunde an diesem Tumormodell bestätigen im wesentlichen die Ergebnisse am Yoshida-Sarkom. Wie aus Tab. 14 hervorgeht, zeigen sich auch am Sarkom 180 die Urethan-Loste IX-XIV den übrigen Verbindungen überlegen. Alle Urethan-Derivate erzielten mit einer Dosis von 40 - 65 % der $DL_{50(1)}$ signifikante Tumorstillwachstumshemmungen von 50 - 70 %. Am Beispiel von X ist zu erkennen, daß diese Verbindungen bereits in relativ geringen Mengen eine maximale Tumorstillhemmung bewirken, die sich durch Erhöhung der Dosis nicht mehr steigern läßt. Bei den aromatischen Urethan-Derivaten XIII und XIV war keine so ausgesprochene Überlegenheit, wie am Yoshida-Sarkom, zu beobachten.

Mit dem Harnstoff-Derivat XV und den Vergleichsverbindungen XVI-XIX konnten signifikante Wachstumsstillhemmungen nur durch Substanzmengen erreicht werden, die im toxischen Bereich lagen.

Erwartungsgemäß war auch am Sarkom 180 die der Verbindung X äquimolare Nor-Lost-Menge unwirksam.

Die geringere Ansprechbarkeit von Sarkom 180 auf N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane wird auch bei anderen Alkylantien beobachtet. So bewirkt N-Methyl-Lost nach Applikation von 50 % der $DL_{50(1)}$ eine Wachstumsstillhemmung von nur 42 %.

Auch die Versuche am Sarkom 180 deuten auf eine Überlegenheit der N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane gegenüber N-Methyl-Lost hin.

Tabelle 14: Prüfung der N-Lost-Derivate am Sarkom 180 der Maus

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumorgewicht ⁺		Tumorstums- hemmung in %	Signifikanz ⁺ + -
	mg/kg	=DL ₅₀ (1)	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
IX	15	65	5	12	19	0,28	1,04	74	+
X	20	35	8	20	17	0,46	0,94	51	+
	56	98,5	8	9	9	0,2	0,55	64	+
XI	20	50	8	20	17	0,28	0,59	53	+
XII	20	50	8	19	17	0,28	0,59	53	+
XIII	32	53,5	8	20	17	0,2	0,59	66	+
XIV	32	53,5	8	18	17	0,18	0,59	70	+
XV	20	54	8	17	17	0,64	0,59	32	-
	35	94,5	8	10	6	0,41	0,7	40	-
XVI	80	160	8	19	19	0,53	1,04	49	+

Tabelle 14 (Fortsetzung):

Prüfung der N-Lost-Derivate am Sarkom 180 der Maus

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumorgewicht ⁺		Tumorstums- hemmung in %	Signifikanz ⁺ + -
	mg/kg	= DL ₅₀ (1)	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
XVII	42	100	8	9	9	0,18	0,55	67	+
	42	100	8	10	6	0,23	0,7	69	+
XVIII	63	97	10	6	9	0,25	0,55	55	-
	63	97	10	9	6	0,4	0,7	43	-
XIX	40	133	8	19	19	0,58	1,04	40	+
Nor- Lost ++	30	8	8	10	9	0,4	0,58	31	-
	30	8	8	10	9	0,67	0,7	-	-

+ nähere Angaben siehe Seite 15
 ++ als Base appliziert

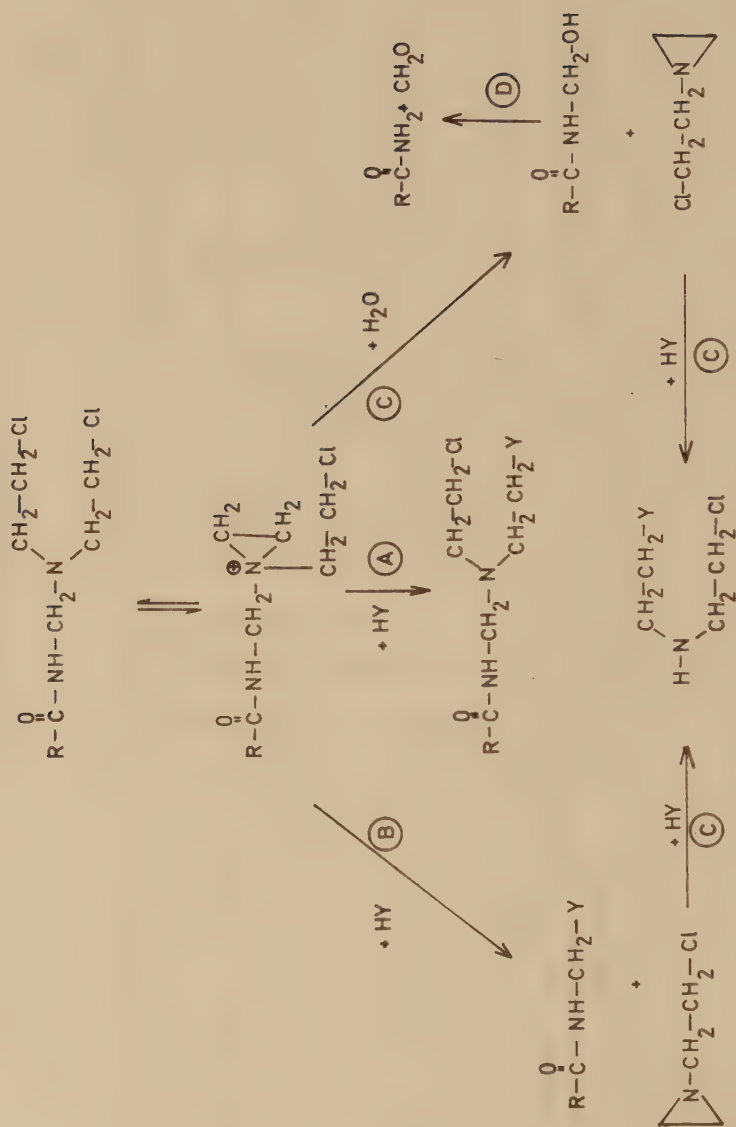


Abbildung 16: Wirkungsmechanismus der acylierten Nor-Lost-Aminale

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus

Aus zahlreichen Untersuchungen an Lost-Derivaten ist bekannt, daß eine enge Beziehung zwischen chemischer Reaktivität (Aminoäthylierung) und tumorhemmender Wirkung besteht (98). Die Zusammenhänge hat Bindl (52) eingehend in der Klasse der acylierten N-Lost-Aminale untersucht. Durch Messung der Cl^- -Hydrolyse am pH-Stat bei pH 7, 35 und 37° in verschiedenen DMSO/Wasser- und Aceton/Wasser-Gemischen, durch qualitative und halbquantitative dünnschichtchromatographische Untersuchungen und durch die Reaktion mit 4-(4'-Nitrobenzyl)-pyridin (NBP-Probe) kam er zu der in Abb. 16 dargestellten Formulierung des Reaktionsmechanismus.

Die tumorhemmende Wirkung der N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamide beruht nach diesen Untersuchungen in erster Linie auf der Reaktion des Gesamtmoleküls mit biologischen Substraten. Die Reaktivität und Wirkung der acylierten N-Lost-Aminale ist gegenüber Nor-Lost stark erhöht. Ein Wirkungsmechanismus, der auf einer Freisetzung des latenten Nor-Losts beruht, konnte ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der eigenen Arbeit wurden diese Untersuchungen auf N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane ausgedehnt. Es wurde geprüft, ob die Wirkung auf folgende Vorgänge zurückzuführen ist:

- a. Freisetzung von Nor-Lost,
- b. Reaktion des Gesamtmoleküls,
- c. gesteigerte Reaktivität gegenüber Nor-Lost.

Weiterhin wurde durch Versuche mit Verbindung X festgestellt, in wieweit N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane wirkungsmechanistisch den aromatischen N-Lost-Verbindungen entsprechen. Bei den N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamidinen konnte eine solche Beziehung nachgewiesen werden (52).

Tabelle 15: Formaldehydabspaltung der N-Lost-N-Mannich-Basen (52)
 2×10^{-4} Mol Substanz. Gesamtvolumen 50 ml
 Zeit 120 Minuten. pH 7,35, 37°

Substanz Nr.	IX	X	XIV	XV	XVII	XVIII
% Hydrolyse	15,7	24,0	23,0	56,1	78,5	76,5

Tabelle 16: Cl^- -Abspaltung der N-Lost-N-Mannich-Basen in 10% DMSO
 2×10^{-4} Mol Substanz. Gesamtvolumen 50 ml
 pH 7,35, 37°

Substanz Nr.	Reaktionszeit in Minuten						
	10	20	30	40	50	60	120
IX	30	44	51	55	58	60	63
X	30	44	50	55	58	60	64
XIV	12,5	22,8	33	40,5	48	51,5	72,2
XV	25,4	32	36	38,2	40	40,5	44
XVI	15	25	32	36	40	42	47,5
XVII	22,5	34,5	43	50	52,5	54,5	58,0
XVIII	17,5	30	37,5	43	46	48	53,5
XIX	9,5	16,5	22,5	28	32	36	49
Nor- Lost	19	31	39	45	48,5	51,5	57,5

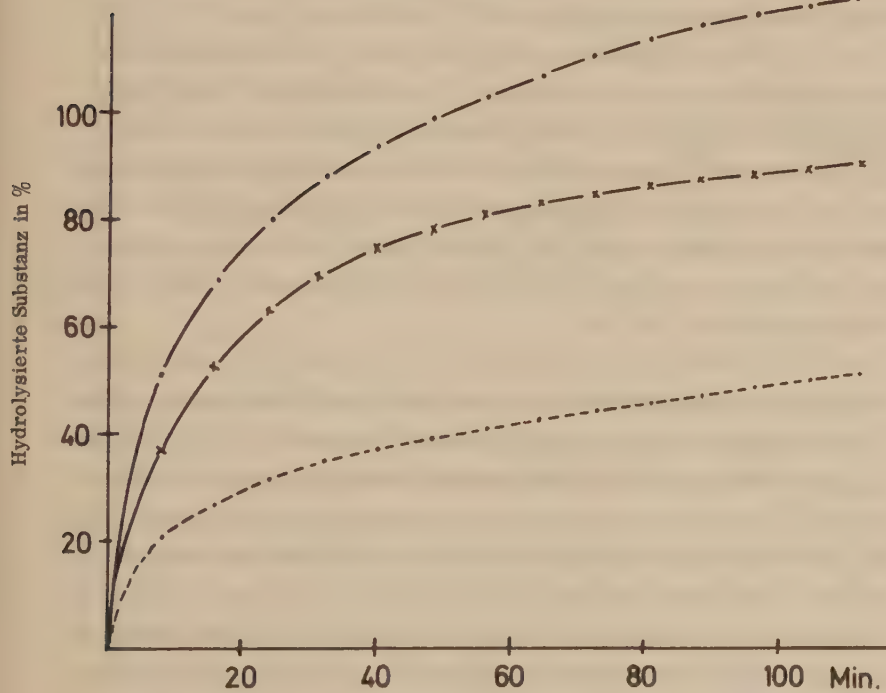
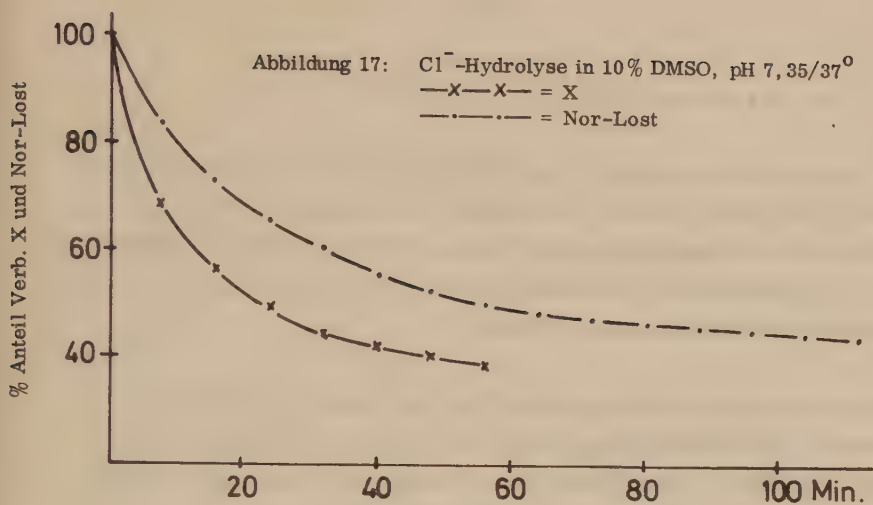


Abbildung 18: Cl^- -Hydrolyse in 50% DMSO, pH 7, 35/37°

-.-.-.- = XIV
 —x—x— = X
 -.-.-.- = Phenylurethan

1. Cl^- -Hydrolyse und Aminalspaltung

Wie Untersuchungen von Bindl (52) an N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benz-amiden gezeigt haben, ist die Chlorionenhydrolyse der acylierten Nor-Lost-Aminale stets mit einer Spaltung des Moleküls zu N-Hydroxymethyl-carbonamid bzw. zu Formaldehyd und Carbonamid (Abb. 16, Weg D) einerseits und zu β -Chloräthylaziridin andererseits verbunden.

Die Spaltung der Aminalbindung verläuft jedoch im Vergleich zur Chlorionenhydrolyse verhältnismäßig langsam ab und ist in 50%igem DMSO und 50%igem Aceton weitgehend zurückgedrängt. Dieses Verhalten trifft nach unseren Untersuchungen auch für die N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane zu, wie der Vergleich der Cl^- -Hydrolysekurven von IX, X und Nor-Lost zeigt (Tab. 16, Abb. 17 und 17 a). Eine vorwiegende Abspaltung der latenten Lost-Komponente müßte zu einer gegenüber Nor-Lost verzögerten Cl^- -Hydrolyse führen. Daß aber mit zunehmender Hydrolysedauer doch ein steigender Zerfall der N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane stattfindet, läßt sich aus folgenden Befunden entnehmen: auch bei längerer Versuchsdauer wird keine 100%ige Abspaltung von Cl^- beobachtet (Verfälschung der Werte durch Abspaltung von β -Chloräthylaziridin); nach 120 Minuten Hydrolysedauer sind bereits merkliche Mengen Formaldehyd (16 und 24 %) nachweisbar (Tab. 15).

Die größere Hydrolysegeschwindigkeit von IX und X deutet weiter daraufhin, daß vor der Abspaltung von Nor-Lost die Aziridinform gebildet wird. Dieser Cyclisierungsschritt ist aufgrund der geringen Basizität im Vergleich zu Nor-Lost verlangsamt. Die hydrolytische Spaltung des Aziridinrings ist jedoch beschleunigt, so daß insgesamt gesehen, eine erhöhte Cl^- -Hydrolysegeschwindigkeit resultiert.

Ein abweichendes Verhalten in der Urethan-Reihe zeigt N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-phenylurethan (XIV). Es werden bei der Messung der Cl^- -Hydrolyse Werte erhalten, die erheblich über den theoretisch möglichen Werten liegen (Abb. 18). Dieses Phänomen erklären wir mit der gleichzeitigen Spaltung des

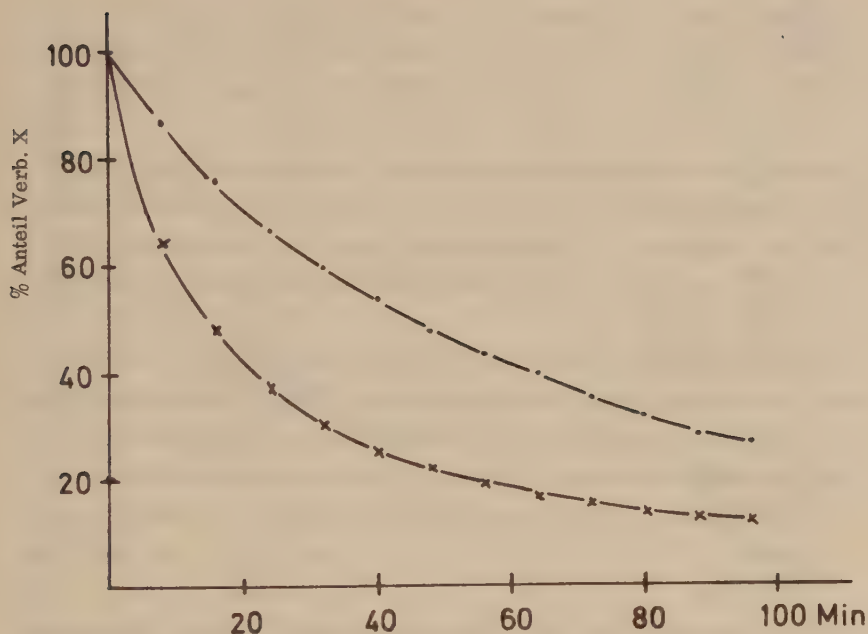


Abbildung 17 a: Cl^- -Hydrolyse (pH 7, 35, 37°) von X

—x—x in 50% DMSO
 —. —. —. in 50% Aceton

Phenylurethans zu Phenol und Nor-Lost-Carbamatsalz. In einem Parallelversuch stellten wir fest, daß Phenylurethan unter den Reaktionsbedingungen von 37° und pH 7, 35 (in 50% DMSO) nach 120 Minuten zu 50% zersetzt wird. Aliphatische Urethane, wie Äthylurethan, sind unter den gleichen Bedingungen stabil.

Berücksichtigt man den Laugenverbrauch für die Spaltung von Phenylurethan, so gelangt man zu dem Schluß, daß die Cl^- -Hydrolyse der Verbindung XIV geringer ist als die der Verbindung X.

Der nach 120 Minuten beobachtete Formaldehydwert für XIV entspricht dem des Äthylurethan-Derivates X (Tab. 15).

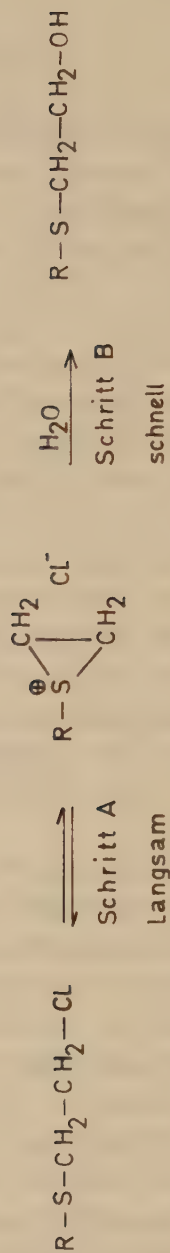
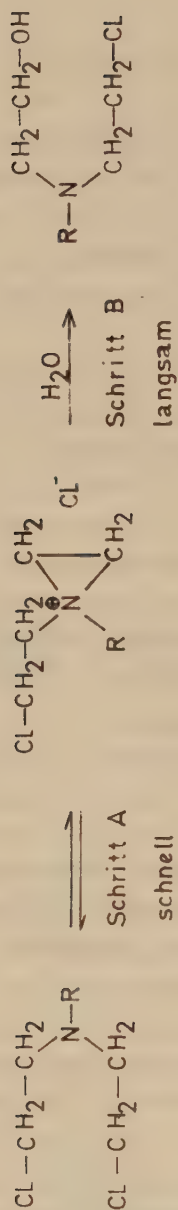


Abbildung 19: Mechanismus der Hydrolyse von aliphatischen N-Losten und von β -Chloräthylsulfiden

2. Bestimmung der Reaktionsordnung für N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-äthylurethan (X) in 50 % Aceton und 50 % DMSO

Eine kinetische Auswertung der Hydrolysekurven von acylierten Lost-Aminalen ist nach Bindl (52) durch Zusatz von 50 % Aceton bzw. 50 % DMSO möglich, da hier die störende Aminalspaltung so weit zurückgedrängt ist, daß sie sich erst nach weitgehendem Ablauf der Hydrolyse bemerkbar macht.

Die Frage nach dem Mechanismus der Cl^- -Hydrolyse der Urethan-Lost-Aminale untersuchten wir an N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-äthylurethan (X). In 50 % Aceton/Wasser gehorcht die Hydrolyse bis weit über 50 % einer Kinetik 1. Ordnung, d. h. unter diesen Bedingungen ist Schritt B schneller als Schritt A. Trägt man den Logarithmus der Konzentration gegen die Zeit auf, so resultiert eine Gerade (Abb. 20).

Eine Kinetik 1. Ordnung wurde bei Bis-(2-chloräthyl)-sulfid beobachtet (Abb. 19).

Unter Zusatz von 50 % DMSO gehorcht die Hydrolyse einer Kinetik 2. Ordnung, d. h. Schritt A ist schneller als Schritt B (siehe Abb. 19: N-Methyl-Lost). Trägt man den reziproken Wert der Konzentration gegen die Zeit auf, so resultiert eine Gerade (Abb. 21). Eine solche Verschiebung beim Übergang von Aceton zu DMSO beobachtet man auch bei aromatischen Lost-Verbindungen (67) und acylierten Lost-Aminalen (52).

Für N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane ist daher ein den aromatischen Losten Sarkolysin^R und Chlorambucil^R, sowie den acylierten Lost-Aminalen vergleichbares reaktionsmechanistisches Verhalten gegeben.

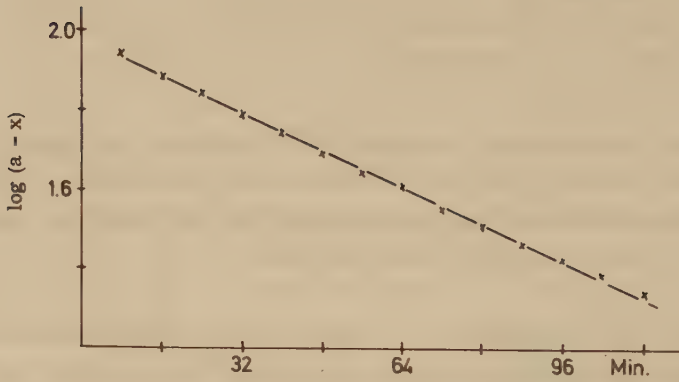


Abbildung 20: Hydrolyse von X in 50% Aceton, pH 7, 35/37°

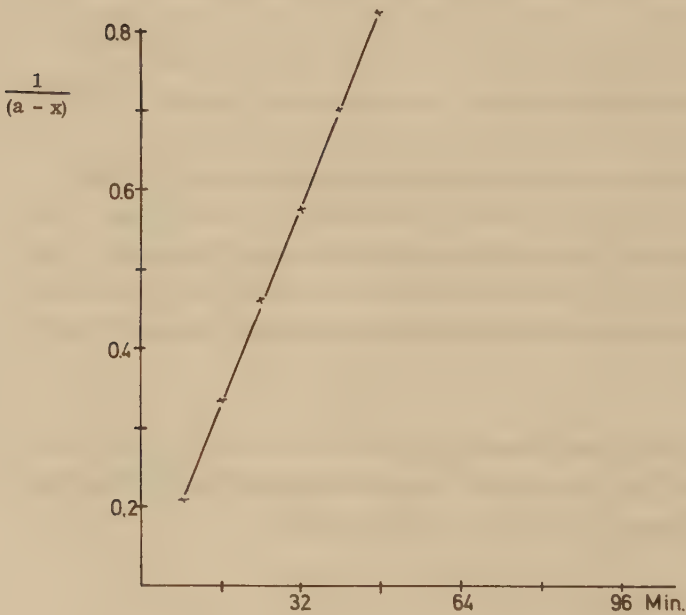


Abbildung 21: Hydrolyse von X in 50% DMSO, pH 7, 35/37°

Diskussion

Die Urethan-Lost-Aminale (IX-XIV) übertreffen in ihrer tumorhemmenden Wirkung die Harnstoff-Verbindung (XV) und die zum Vergleich herangezogenen N-Lost-Mannich-Basen (XVI-XIX). Diese unterschiedliche Aktivität ist in der abweichenden Reaktivität begründet. Folgende Wirkungsmechanismen sind daher zu diskutieren:

Mechanismus der Urethan-Derivate (Abb. 16 und 22):

Die analytischen und biologischen Versuchsergebnisse zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit denen der N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamide. Für Urethan-Loste ist deshalb der gleiche Mechanismus wahrscheinlich.

Im Vordergrund der wirkungsmechanistischen Betrachtungen steht die Amino-äthylierung biologischer Substrate durch die ungespaltene Verbindung (Weg A). Die kinetischen Untersuchungen haben für beide Stoffklassen ein den Anilin-Losten ähnliches reaktionsmechanistisches Verhalten ergeben. Die Ursache hierfür ist in den ähnlichen $p'K_a$ -Werten der drei Verbindungstypen zu suchen.

Weiterhin ist die Amidomethylierung nucleophiler, biologisch wichtiger Substrate zu diskutieren. Durch Ausbildung eines Aziridiniums werden die tertiären Aminale so reaktiv, daß eine Amidomethylierung möglich wird (Weg B).

Die Spitzenwirkung von XIV in der Urethanreihe steht möglicherweise in einer engen Beziehung zu der Spaltung in Phenol und Lost-Carbamatsalz, das unter physiologischen Bedingungen anscheinend relativ stabil ist. Ein Hinweis darauf ist, daß nach 120 Minuten nur 23% des in der Verbindung enthaltenen Formaldehyds abgespalten werden.

Das Nor-Lost-Carbamatsalz ist wahrscheinlich in erster Linie zur Aminoäthylierung und daneben zur Amidomethylierung in Form des Gesamt-moleküls befähigt

(Abb. 22, Weg D). Weiterhin ist eine Amidomethylierung, sowie eine Aminoäthylierung biologischen Substrats durch abgespaltenen Nor-Lost und β -Chloräthylaziridin denkbar. Eine Beteiligung des freigesetzten Phenols an der Wirkung ist ebenfalls zu diskutieren.

Mechanismus der Vergleichverbindungen (Abb. 16):

Die verhältnismäßig schwache Wirkung der Vergleichsverbindungen XVI-XIX und des Harnstoff-Losts XV hat wahrscheinlich ihre Ursache in einer geringeren Reaktivität des Gesamtmoleküls. Wirkungsursache ist demzufolge die Aminoäthylierung biologisch wichtiger Substrate durch abgespaltenen Nor-Lost und abgespaltenes β -Chloräthylaziridin (Weg C). Die Aminoäthylierung durch das Gesamtmolekül tritt dagegen in den Hintergrund.

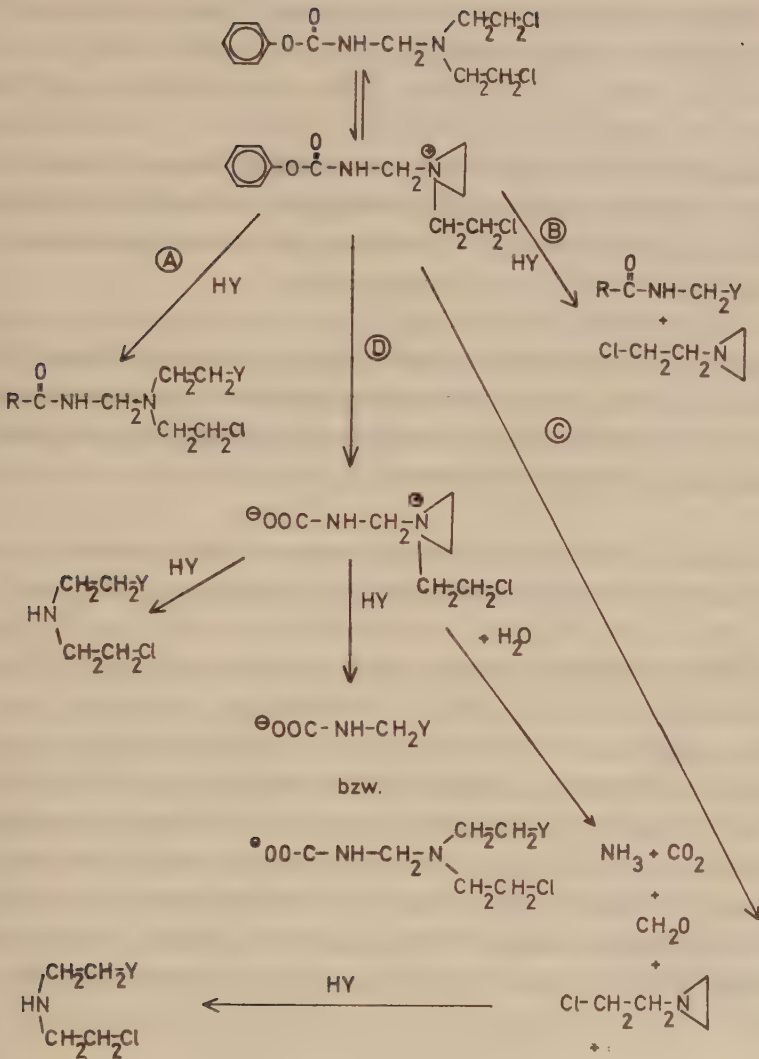


Abbildung 22: Wirkungsmechanismus von N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-phenylurethan (XIV)

D. α -Aminoalkylantien - Synthese und Prüfung auf tumorhemmende Wirkung

Unter den alkylierenden Cytostatica hat in den vergangenen Jahren die Klasse der α -Aminoalkylantien zunehmend an wissenschaftlichem Interesse gewonnen. Eine Verbindung dieses Wirkstofftyps, das Trihydroxymethyl-melamin, wurde unter der Bezeichnung Cealysin^R in die Therapie eingeführt.

Die tumorhemmende Wirkung von Trihydroxymethyl-melamin wurde bereits 1950 im Rahmen von Screening-Versuchen von Rose, Hendry et al. (59, 70) erkannt und später von verschiedenen Arbeitskreisen bestätigt (71, 72, 73). Es findet bei der Chemotherapie von Malignomen Verwendung.

Pharmakologische und biochemische Versuchsergebnisse ordnen Trihydroxymethyl-melamin in die Klasse der alkylierenden Cytostatica ein.

In den proliferierenden Tumorzellen beobachtet man nach der Verabreichung von Trihydroxymethyl-melamin chromosomale Veränderungen, wie Pyknosen, Chromosomenbrüche und Brückenbildung, die für alkylierende Cytostatica typisch sind (59, 72). In Übereinstimmung damit sind die Nebenwirkungen von Trihydroxymethyl-melamin gegen proliferierende Gewebe, wie Darmepithel, Keimepithel, hämatopoetisches und lymphatisches System, gerichtet (71, 73). Hervorstechend ist das starke Absinken der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen nach hohen Trihydroxymethyl-melamin-Gaben, das allgemein bei der Applikation von Alkylantien beobachtet wird. Verschiedene Versuche ergaben Hinweise auf carcinogene Wirkung.⁺

⁺ Nach Hendry et al. (59) besteht bei Alkylantien eine enge Beziehung zwischen tumorhemmender, carcinogener und cytostatischer Wirkung. Eine carcinogene Wirkung konnte Druckrey (83) bei Bis-morpholino-methan beobachten.

Biochemische Untersuchungen, die an anderen Hydroxymethylamin-Derivaten, wie N-Hydroxymethyl-succinimid, vorgenommen wurden, ergänzen dieses Bild (84). Sie führen, wie alkylierende Cytostatica vom N-Lost-Typ, zu einer Hemmung der anaeroben Glykolyse, senken den NAD- und ATP-Gehalt in Tumorzellen und steigern in ihnen die Nicotinsäureamid-, Fructosediphosphat- und Triosephosphat-Konzentration. Diese Veränderungen treten nach vorheriger Applikation von Nicotinsäureamid nicht ein.

Nachdem das wirkungsmechanistische Prinzip von Trihydroxymethyl-melamin, die Aminomethylierung biologischer Substrate, erkannt und auf deren Parallelen zur Aminoäthylierung der N-Lost-Verbindungen hingewiesen wurde (84, 85), haben zahlreiche synthetische Bemühungen zur Auffindung weiterer dem Trihydroxymethyl-melamin überlegener Verbindungen begonnen (52, 84-91).

Es wurde eine Anzahl von Verbindungen gefunden, die am Ascites-Tumor eine ausgezeichnete Wirkung aufweisen (84, 85). Im Gegensatz zu Trihydroxymethyl-melamin konnte jedoch mit diesen Substanzen an soliden Tumoren, die den Verhältnissen beim Menschen eher entsprechen, keine nennenswerte Wirkung erzielt werden.

Im Zusammenhang mit der Suche nach Verbindungen mit einer dem Trihydroxymethyl-melamin vergleichbaren oder überlegenen Wirkung wurden auch N-Lost-Mannich-Basen synthetisiert (52, 91, Kap. C), die beide Wirkprinzipien - Aminomethylierung und Aminoäthylierung - in sich vereinigen. Unter diesen neuen Verbindungen zeichnen sich die N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamide und die N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane durch eine dem Trihydroxymethyl-melamin und dem N-Methyl-Lost gleichwertige oder überlegene Wirkung aus.

Die unterschiedliche Wirkung aminomethylierender Verbindungen an verschiedenen Tumorsystemen (intratumorale Applikation beim Ascites-Tumor - tumorferne Applikation bei soliden Tumoren) deutet auf einen Zusammenhang zwischen tu-

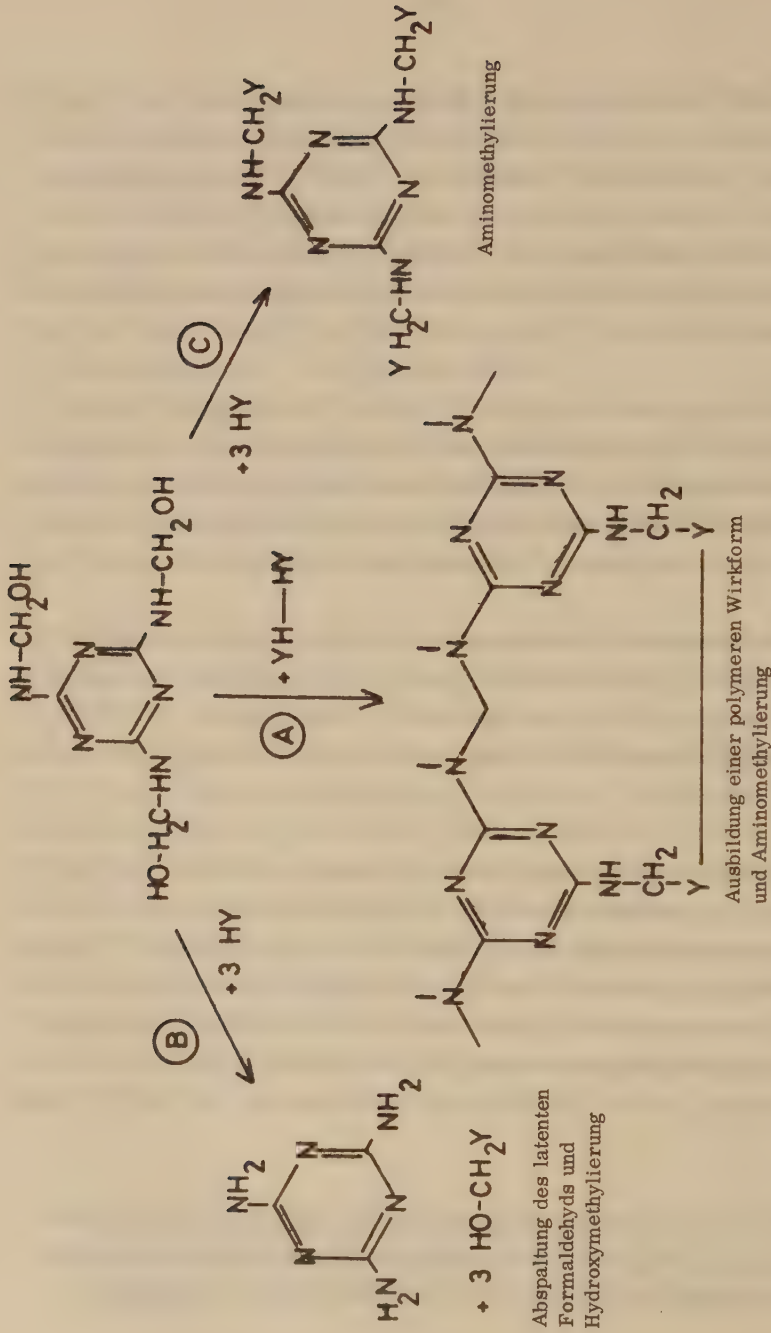
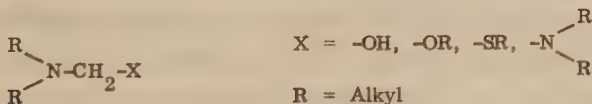


Abb. 23 Wirkungsmechanismus von Trihydroxymethyl-melamin (XX)

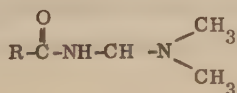
morhemmender Wirkung und reaktionskinetischem Verhalten der Verbindungen hin. Darüberhinaus ist eine wesentliche Bedeutung auch dem "cross-linkage"-Effekt, einer Verknüpfung der DNS mit Proteinen oder einer Vernetzung beider DNS-Stränge einer Doppelhelix (59, 93) über zwei reaktive Zentren des Cytostaticums, zuzuschreiben. Folgen des letzteren Ereignisses sind ein Bruch der DNS-Molekel oder die Bildung von Tochtermolekeln bei der DNS-Verdoppelung, die ein Basenpaar weniger besitzen. Ein solcher "cross-linkage"-Effekt wurde bereits von Hendry et al. (59) für Trihydroxymethyl-melamin diskutiert. Danach permeiert diese Verbindung in die Tumorzelle und bildet dort polymere Ketten unter Beteiligung zweier Hydroxymethylgruppen eines Melaminkernes. Die dritte Hydroxymethylgruppe ist für die Bindung an Proteine und Nucleinsäuren zuständig. Durch Anwesenheit mehrerer reaktiver Hydroxymethylgruppen ist eine "cross-linkage"-Verknüpfung möglich (Abb. 23, Weg A). Die Theorie der Entstehung von niederkettigen Polymeren in der Tumorzelle, die dort biologische Substrate aminomethylieren, basiert auf der Beobachtung, daß verschiedene bifunktionelle N-Hydroxymethyl-melamine nur wenig wirksam sind.

Im Widerspruch zur Bedeutung eines "cross-linkage"-Effektes für die tumorhemmenden Eigenschaften von α -Aminoalkylantien steht die Beobachtung, daß monofunktionelle Verbindungen der Formel

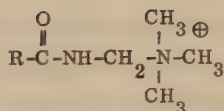


am Ehrlich'schen Ascites-Tumor ausgeprägte tumorhemmende Eigenschaften aufweisen.

Der Nachweis einer Aminomethylierung biologischer Substrate unter physiologischen Bedingungen wurde von Bindl (52) am Beispiel der Umsetzung von



und



versucht. Er gelang ihm lediglich bei den quartären Aminalen. Weitzel (84) konnte durch Bestimmung von nicht umgesetztem Cystein bzw. Glutathion ebenfalls das Fehlen einer solchen Reaktion bei Hydroxymethylamiden nachweisen. Dagegen stellte er eine sehr schnell verlaufende Reaktion mit Cystein und Glutathion bei einfachen Hydroxymethylaminen und -imiden (z. B. Hydroxymethyl-succinimid) fest (vgl. Abb. 23, Weg C). Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Reaktionsvermögen mit SH-Verbindungen, der Stabilität (Abspaltung von Formaldehyd) und dem Auftreten einer Wirkung am Ascites-Tumor beobachtet (57). Stabile Verbindungen waren stets unwirksam.

Neben einem Wirkungsmechanismus, der auf der Aminomethylierung biologischer Substrate beruht, wurde die Freisetzung latenten Formaldehyds in der Tumorzelle als Wirkprinzip diskutiert (Abb. 23, Weg B). Diese Vorstellungen werden durch die Beobachtung gestützt, daß nur labile Halbacetale und Aminale (sie spalten in Wasser Formaldehyd ab) am Ehrlich'schen Ascites-Tumor wirken (57, 84). Nach verschiedenen Untersuchungen ist ein solcher Mechanismus jedoch wenig wahrscheinlich. So zeigt Trihydroxymethyl-melamin am Walker-Tumor eine 100%ige Wachstumshemmung (59), während das Spaltprodukt Melamin keine und die der Verbindung entsprechende Menge Formaldehyd nur eine geringfügige Wirkung aufweisen (59, 73). Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Eichler (94) am Ehrlich'schen Ascites-Tumor und Walker-Tumor. Dagegen gelang Weitzel, allerdings mit erheblich größeren Formaldehyd-Dosen, als in wirksamen Halbacetalen und Aminalen enthalten ist, eine deutliche Beeinflussung des Ehrlich'schen Ascites-Tumors (84).

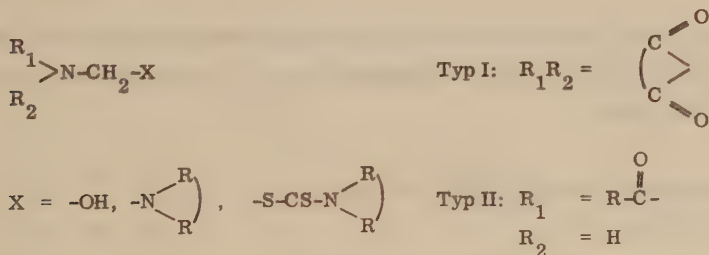
Einen erstaunlichen Unterschied bezüglich der tumorhemmenden Wirkung zeigen Trihydroxymethyl-melamin und die von Weitzel (84) und Schönenberger (85) aufgefundenen monofunktionellen α -Aminoalkylantien. Trihydroxymethyl-melamin

ist an soliden Tumoren wirksam (59, 70, 94), während monofunktionelle α -Aminoalkylantien keine Wirkung zeigen. Umgekehrt verhalten sie sich am Ehrlich'schen Ascites-Tumor; hier sind monofunktionelle α -Aminoalkylantien in ihrer Wirkung erheblich überlegen. Trihydroxymethyl-melamin wirkt am Ascites-Tumor nur lebensverlängernd (71).

In Übereinstimmung damit steht die Beobachtung, daß der Ascites-Tumor bei tumorferner Applikation monofunktioneller α -Aminoalkylantien nur wenig beeinflusst wird (84). Anscheinend reagieren die hochaktiven Verbindungen auf dem Weg zum Tumor mit unspezifischen Rezeptoren. Es ist zu erwarten, daß Stoffe, die in ihrem Reaktionsverhalten zwischen den hochreaktiven, am Ascites-Tumor wirksamen Verbindungen und den reaktionsträgen Verbindungen stehen, auch am soliden Tumor wirken.

Diese Feststellung führte in unserem Arbeitskreis zur Aufnahme folgender Untersuchungen:

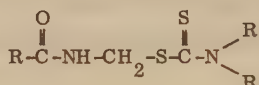
Bindl (52) und Lippert (86) variierten R_1 , R_2 und X in Verbindungen der nachstehenden Formel:



Bei Verbindungen vom Typ I und Typ II wurde erwartet, daß sie sich durch eine geringere Reaktivität auszeichnen und so die günstigen, für eine Wirkung an soliden Tumoren erforderlichen chemischen Eigenschaften von Trihydroxymethyl-melamin erreichen. Die neuen tertiären acylierten Halbacetale und Aminale waren jedoch relativ stabil und am soliden Tumor unwirksam (52). Durch Quarternisie-

rung konnte die Reaktivität wieder hergestellt werden. Diese Verbindungen waren aber am Yoshida-Sarkom unwirksam (eventuell zu hohe Reaktivität). Eine genauere Prüfung quartärer, reaktiver acylierter Aminale an verschiedenen Tumorsystemen, die für eine abschließende Beurteilung erforderlich ist, steht allerdings noch aus.

Andere Versuche hatten zum Ziel, die beobachtete Wirkung von N-Dimethyldithiocarbaminsäure-dimethylaminomethylester am Yoshida-Sarkom - 40 % Wachstums hemmung und sehr gute Wirkung am Ascites-Tumor (85) - durch strukturelle Abwandlung zu verbessern. Die neuen Verbindungen der Formel



zeigten jedoch keine nennenswerte tumorhemmende Wirkung (86).

In früheren Versuchen mit polyfunktionellen α -Aminoalkylantien konnten wir neben einer ausgeprägten Wirkung am Ascites-Tumor auch eine schwache Hemmung von soliden Tumoren beobachten (85).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Beobachtung erneut aufgegriffen und eine größere Zahl polyfunktioneller α -Aminoalkylantien am Yoshida-Sarkom und am Sarkom 180 geprüft.

Bei den neuen Verbindungen handelt es sich um

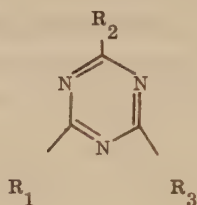
- a. Trihydroxymethyl-melamin-Abkömmlinge,
- b. Hexahydro-s-triazin-Abkömmlinge.

Neben der tumorhemmenden Wirkung wurden die Zusammenhänge zwischen Stabilität, Reaktivität und Wirkung näher untersucht.

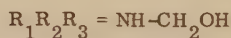
Als weitere Gruppe wurden mono- und difunktionelle α -Aminoalkylantien, die sich von Äthylurethan, Harnstoff, Biuret und Dicyandiamid ableiten, in diese Untersuchungen aufgenommen.

I. Trihydroxymethyl-melamin. Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen Struktur und tumor-hemmender Wirkung

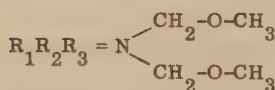
Die Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung wurden an folgenden s-Triazin-Abkömmlingen untersucht:



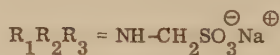
XX N, N', N''-Trihydroxymethyl-melamin



XXI N, N, N', N', N'', N'''-Trihydroxymethyl-melamin



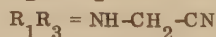
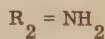
XXII Melamin-N, N', N''-trimethyl-mefomaures Natrium



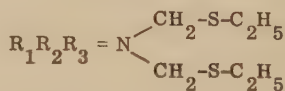
XXIII 2-Chlor-4, 6-dicyanomethyl-amino-s-triazin



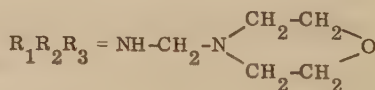
XXIV N, N'-Dicyanomethyl-melamin



XXV N, N, N', N', N'', N'''-Hexaäthylthiomethyl-melamin



XXVI N, N', N'''-Tris-(morpholinomethyl)-melamin



Ihre Herstellung erfolgte analog (58).

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der tumorhemmenden Wirkung von der Stabilität (Fähigkeit zur Abspaltung von Formaldehyd) und Reaktivität (Fähigkeit zur Amino-methylierung von Morpholin) unter physiologischen Bedingungen untersucht.

Aufgrund der unterschiedlichen Reste ($-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{SO}_3\text{Na}$, $-\text{CN}$, $-\text{N} \begin{smallmatrix} \text{R} \\ \diagup \\ \text{R} \end{smallmatrix}$) ist bei den ausgewählten s-Triazin-Derivaten eine unterschiedliche Reaktivität und damit auch eine abgestufte tumorhemmende Wirkung zu erwarten.

Untersuchungen auf tumorhemmende und antimikrobielle Wirkung

1. Prüfung am Yoshida-Sarkom der Ratte

Wie aus Tab. 19 hervorgeht, besitzt die Verbindung XX an diesem Tumormodell eine hervorragende tumorhemmende Wirkung. In zwei Therapieversuchen ist an allen tumortragenden Tieren ein Heilerfolg zu verzeichnen. Verbindung XXIII verzögert in einem Versuch das Tumorwachstum bis zu 60%. Dieser Befund ist mit Vorbehalt zu bewerten, da die Tiere unter der Behandlung bis zu 50% ihres ursprünglichen Gewichts verlieren und frühzeitig sterben (mittlere Lebensdauer: 14,7 Tage). Die allgemeine körperliche Verfassung der Tiere ist als mögliche Ursache für das verzögerte Tumorwachstum zu diskutieren (74). Die Verbindung XXIV bewirkt eine Wachstumshemmung von 44%. Alle übrigen Verbindungen sind unwirksam.

2. Prüfung am Sarkom 180 der Maus

Nach Untersuchungen von Bindl (52), sowie nach eigenen Untersuchungen (siehe Seite 58) spricht das Sarkom 180 gegenüber alkylierenden Cytostatica schlechter an als das Yoshida-Sarkom. Dieser Tatsache entsprechend zeigen auch die s-Triazin-Derivate eine erheblich geringere Wachstumshemmung an diesem Tumormo-

dell. Wie am Yoshida-Sarkom war auch hier mit XX die beste Wirkung zu erzielen (Tab. 18). Jedoch konnte selbst mit einer Gesamtdosis von 4.000 mg/kg (= 163 % der $DL_{50(1)}$) nur eine Hemmung von 65 % erreicht werden. Ein völliger Rückgang des Tumors wurde in keinem Fall beobachtet. Neben XX zeigte nur noch XXIV eine vergleichbar signifikante Hemmung von 55 %. Dieses Ergebnis ist umso erstaunlicher, da die Verbindung unter physiologischen Bedingungen nicht zur Reaktion mit nucleophilen Substraten befähigt ist (siehe Seite 91). Als Wirkungsmechanismus ist ein Pyrimidinantagonismus denkbar (75). Die restlichen Verbindungen zeigen nur eine geringfügige Wachstumshemmung, die unter 35 % liegt.

3. Prüfung auf antimikrobielle Wirkung

In weiteren Untersuchungen wurde die antimikrobielle Wirkung der s-Triazin-Derivate studiert. Mit gewissen Einschränkungen kann durch eine in-vitro-Prüfung von Verbindungen an Bakterien und Pilzen ein Rückschluß auf mögliche carcinostatische Effekte gezogen und die Aussagekraft darüber erhöht werden. Die Verbindungen wurden an einem Spektrum von 9 Pilzen, einer Hefeart, 6 grampositiven und 5 gramnegativen Keimen untersucht. Wie aus Tab. 20 hervorgeht, zeigen die Verbindungen XX und XXVI, im Einklang mit der Tumortestung, eine antimikrobielle Wirkung, die im Bereich von 62 - 250 μ g/ml Nährlösung liegt. Alle übrigen Verbindungen sind unwirksam.

Ergänzend zu der Prüfung an Bakterien und Pilzen wurde die aktivste Verbindung XX auf ihre atmungshemmende Wirkung an Staph. aureus SG 511 im Warburg-Apparat untersucht. Aus Abb. 24 ist zu ersehen, daß die latente Formaldehydmenge in XX eine stärkere Atmungshemmung hervorruft als die Verbindung selbst. Dieser Befund, wie auch die schwache antimikrobielle Wirkung von XX, stehen im Gegensatz zu den Befunden, die an den soliden Impftumoren beschrieben sind.

Tabelle 17: Akute Toxizität der s-Triazin-Derivate bei ip. Applikation an Ratte und Maus

Substanz Nr.	DL ₅₀₍₁₎ mg/kg		Darreichungsform ⁺
	Ratte	Maus	
XX	1.750	2.470	10% WS
XXI	550	1.150	10% WL
XXII	7.200	9.660	20% WL
XXIII	3.500	3.000	10% WS
XXIV	1.500	890	10% WS
XXV	>10.000	>12.000	20% OS
XXVI	340	390	10% WL

WL = wäßrige Lösung
 WS = wäßrige Suspension
 OS = ölige Suspension

Tabelle 18: Prüfung der s-Triazin-Derivate am Sarkom 180 der Maus

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumorgewicht ⁺		Wachstums- hemmung in % ⁺	Signifikanz ⁺
	mg/kg	% DL ₅₀₍₁₎	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
XX	2.000	81	5	19	20	57,4	100,5 ⁺⁺	45 ⁺⁺	+
	4.000	163	5	12	15	0,35	0,98	65	+
XXI	1.000	87	5	20	20	103,6	124,5 ⁺⁺	17 ⁺⁺	-
	2.500	218	5	15	15	0,55	0,98	34	+
XXII	3.000	83	8	20	20	77,1	100,5 ⁺⁺	23 ⁺⁺	-
	10.000	140	5	7	9	0,36	0,55	35	-
XXIII	2.000	67	5	19	20	0,49	0,73	32	+
XXIV	425	28	8	20	19	0,25	0,53	53	+
XXV	10.000	^ 70	8	15	19	0,44	0,53	17	-
XXVI	800	246	8	17	17	0,50	0,94	47	-

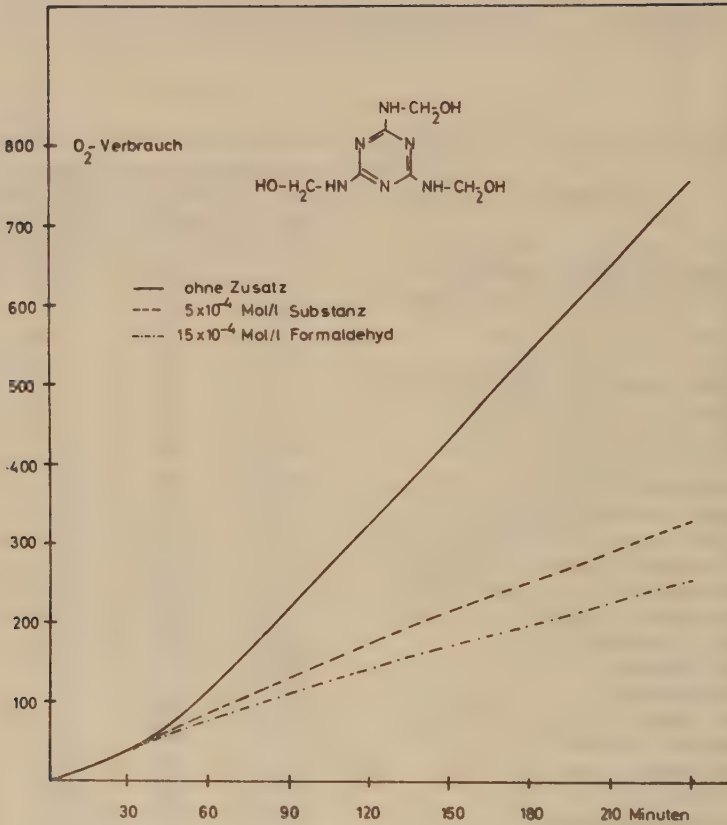
+ näheres siehe Seite 15
 ++ mittlere Tumoroberfläche nach (58)

Tabelle 19:

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumorgewicht ⁺		Überlebende nach 90 Tg.		Mittl. Lebens- dauer in Tagen		Geheilt in %	Wachstums- hemmung in % +
	mg/kg	% DL ₅₀₍₁₎	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
XX	2.100	120	3	5	5	0,2	9,4	5	-	90	29,6	100	99
	1.500	86	6	6	6	0,64	9,1	6	-	90	28,5	100	94
	2.000	114	4	4	4	0,17	5,6	3	-	56	29,6	75	97
XXI	750	136	5	6	6	5,9	8,3	-	-	30,8	27,3	-	26
	1.500	272	5	5	5	6,1	9,4	-	-	25,0	29,0	-	25
XXII	7.500	108	5	6	6	8,0	8,3	-	-	30,5	29,3	-	-
	15.000	208	5	5	5	11,6	9,4	-	-	25,6	29,6	-	-
XXIII	1.000	29	5	4	4	2,9	3,9	-	-	20,7	29,5	-	20
	2.000	57	1	5	5	2,0	5,6	-	-	14,7	24,7	-	60
XXIV	750	50	5	4	4	2,9	3,9	-	-	23,0	29,5	-	20
	1.500	100	1	5	5	0,63	1,85	-	-	15,0	29,6	-	-
XXV	10.000	100	5	5	5	9,8	9,4	-	-	30,4	29,6	-	-
XXVI	600	176	3	5	5	5,2	7,9	-	-	22,4	22,2	-	44

Tabelle 20: Antimikrobielle Wirkung der Triazin-Derivate

Teststamm	Grenzkonzentration in $\mu\text{g/ml}$		
	XX	XXVI	XXI-XXV
<i>Microsporium audouini</i> (HK/1328)	62	125	> 1000
<i>Microsporium distortum</i> George (HK)	62	125	
<i>Microsporium canis</i> (HK/312)	62	125	
<i>Microsporium gypseum</i> (PI)	125	125	
<i>Microsporium gypseum</i> (HK/CBS Bodin)	125	250	
<i>Microsporium gypseum</i> (E/64801)	125	250	
<i>Trichophyton rubrum</i> (HK/1604)	125	250	
<i>Trichophyton schönleinii</i> (PI)	62	62	
<i>Trichophyton schönleinii</i> (HK/1124)	250	250	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (PI)	125	250	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (HK/455)	125	125	
<i>Epidermophyton floccosum</i> (PI/5601)	62	62	> 1000
<i>Epidermophyton floccosum</i> (HK/3766)	62	125	
<i>Sporotrichon schenkii</i> (PI)	250	1000	
<i>Nocardia asteroides</i> (E)	500	1000	
<i>Candida albicans</i> (E/8379-64)	> 1000	> 1000	
<i>Streptomyces</i> (E)	250	250	
<i>Staphylococcus aureus</i> (Test Varia)	125	125	
<i>Enterococcus</i> (E 6666-65)	250	250	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (E)	62	125	
<i>Escherichia coli</i> haem. (E)	250	250	
<i>Proteus providenciae</i> (E)	125	125	> 1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (E/7250)	500	1000	
<i>Salmonella typhimurium</i> (E)	125	125	
Wasser Vibrionen (E)	62	125	
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> (E 14310/66)	125	125	
<i>Shigella flexneri</i> (E/733-55 D/O BUS)	62	125	
<i>Bacillus subtilis</i> (E)	125	125	



Atmung von *Staphylococcus aureus* SG 511 in Gegenwart von Trihydroxymethylmelamin und Formaldehyd

Abbildung 24

Untersuchungen zur Stabilität und Reaktivität

1. Prüfung auf Stabilität

Um die Zusammenhänge zwischen Stabilität und tumorhemmender Wirkung aufzuklären, wurde die Freisetzung des latenten Formaldehyds unter physiologischen Bedingungen studiert. Als Bestimmungsmethoden wurden die Phloroglucin-Methode (76) und die Cystein-Methode (52) angewandt.

Von der Bestimmung des Formaldehyds mit der Dimedon-Methode, wie sie Weitzel (57) durchführte, wurde aus Gründen der langen Reaktionsdauer und der Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich Abstand genommen.

Das Prinzip der Phloroglucin-Methode beruht auf der Bildung eines roten Farbkomplexes aus Formaldehyd mit Phloroglucin im Natronalkalischen, der kolorimetrisch erfaßt wird. Allerdings erfolgt die Bestimmung bei pH 12, was trotz der kurzen Reaktionszeiten zu einer weiteren Formaldehydabspaltung und damit zur Verfälschung der tatsächlichen Hydrolyseverhältnisse führt.

Diese Methode wurde vergleichend mit der Cysteinmethode angewandt, die sich als besonders geeignet für Stabilitätsuntersuchungen unter physiologischen Bedingungen bewährt hat (52).

Wie in Tab. 21 aufgeführt, bestehen zwischen der Cystein-Methode (I) und der Phloroglucin-Methode (II) deutliche Unterschiede in den gefundenen Hydrolysewerten. So liegen die Formaldehydwerte für XX nach II etwa doppelt so hoch als nach I. Verbindung XXII ist nach I stabil, nach II spaltet sie etwa 9% Formaldehyd ab. Diese Überwerte zeigen, daß die Methode II für unsere Untersuchungen wenig geeignet ist. Der Cystein-Methode (I) ist der Vorzug zu geben, da sie im Gegensatz zu II das physiologische Milieu aufrechterhält und damit den tatsächlich anfallenden Formaldehyd erfaßt. Deshalb dient ausschließlich dieses Verfahren als Grundlage für unsere Stabilitätsuntersuchungen.

An Hand dieser Methode konnten wir feststellen, daß lediglich die Verbindungen XX und XXVI instabil sind. Auffallend ist das Hydrolyseverhalten von XX. Diese Verbindung spaltet unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich Formaldehyd ab und erreicht nach etwa 40 Stunden einen Wert, der 50 % des latenten Formaldehyds entspricht (Abb. 25). XXVI dagegen zeigt eine wesentlich höhere Stabilität. Nach 24 Stunden sind nur 11 % des latenten Formaldehyds abgespalten.

Tabelle 21: Stabilität der s-Triazin-Derivate
 Gesamtvolumen 50 ml. pH 7,35, 37°
 1,5 x 10⁻³ Mol Cystein-Methode (I)
 1,5 x 10⁻⁴ Mol Phloroglucin-Methode (II)

Substanz Nr.	Hydrolyse in %					
	1 Stunde		12 Stunden		24 Stunden	
	I.	II.	I.	II.	I.	II.
XX	2	11,8	30	60	45	72
XXI	-	-	0,7	1,0	2,8	1,2
XXII	-	6,8	-	9,2	-	9,2
XXIII	-	-	-	-	-	-
XXIV	-	-	-	-	-	-
XXV	-	-	-	-	-	-
XXVI	0,5		9,5		10,7	

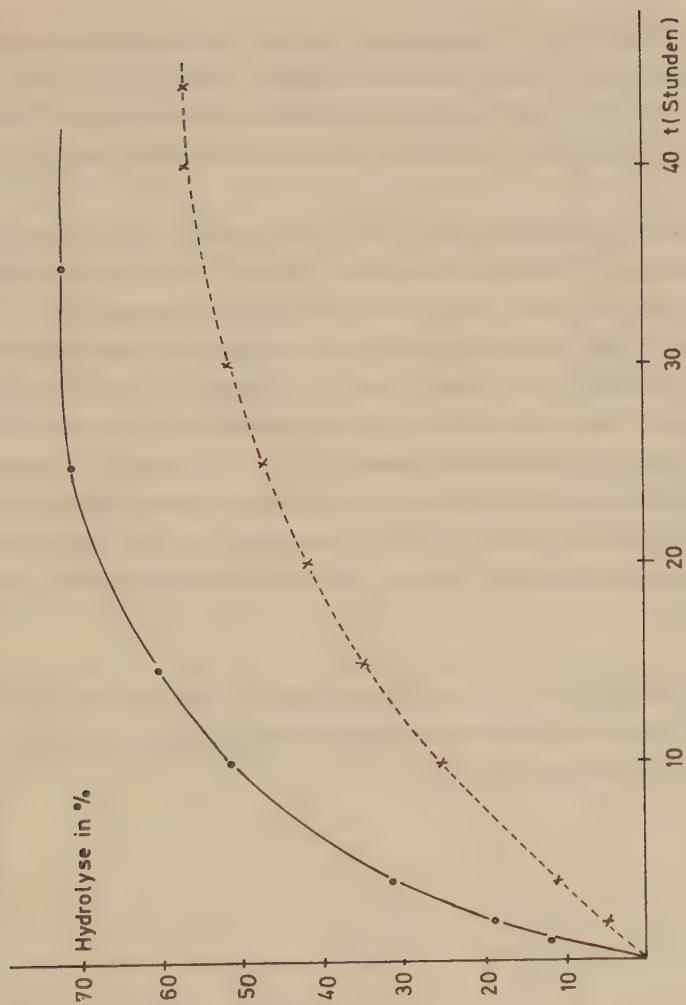


Abbildung 25: Hydrolysegeschwindigkeit von Trihydroxymethyl-melamin - gemessen nach Brugger 1,5 x 10⁻⁴ Mol Bindl —
1,5 x 10⁻³ Mol - - -

2. Prüfung auf aminomethylierende Eigenschaften

Um Aufschluß über die Zusammenhänge zwischen Reaktivität und tumorhemmender Wirkung der s-Triazin-Derivate zu erhalten, wurden ihre Alkylierungseigenschaften am Beispiel der Umsetzung mit Morpholin in Wasser bei pH 7, 35 und 37⁰ untersucht. Die Experimente wurden im pH-Stat durchgeführt (siehe exp. Teil).

An diesem Modell besitzen lediglich die Verbindungen XX und XXIII alkylierende Eigenschaften. Wie in Abb. 26 dargestellt, alkyliert XX Morpholin nach 24 Stunden zu etwa 90 %. Dieser Befund konnte dünnschichtchromatographisch mit dem Nachweis von fast quantitativ gebildetem Tris-(morpholinomethyl)-melamin (XXVI) abgesichert werden. XXIII dagegen setzt sich in derselben Reaktionszeit mit Morpholin zu 60 % um. Die Reaktion von XXIII mit Morpholin beruht vermutlich weniger auf einer Aminomethylierung durch die $-\text{CH}_2-\text{CN}$ -Gruppen, als vielmehr auf einer Substitution des Chlors am s-Triazin-Ring durch Morpholin. Für diese Annahme sprechen die fehlende Formaldehydabspaltung von XXIII und der analogen Verbindung XXIV, sowie die Tatsache, daß Chlor-s-triazine sich leicht mit Aminen umsetzen.

Durch diese Versuche wurde erstmals der Nachweis erbracht, daß Trihydroxymethyl-melamin (XX) unter physiologischen Bedingungen zur Aminomethylierung nucleophiler Substrate befähigt ist.

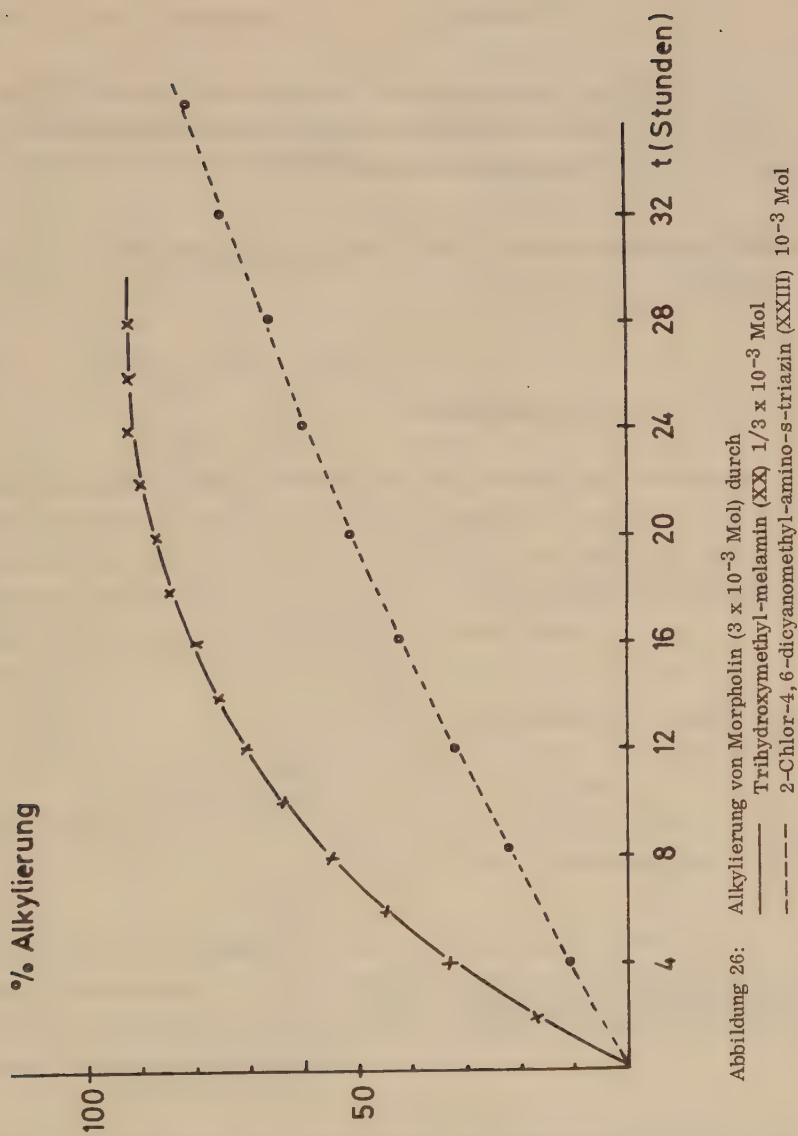


Abbildung 26: Alkylierung von Morpholin (3×10^{-3} Mol) durch

— Trihydroxymethyl-melamin (XX) $1/3 \times 10^{-3}$ Mol

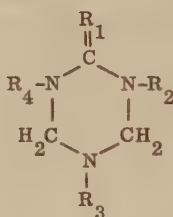
- - - 2-Chlor-4,6-dicyanomethyl-amino-s-triazin (XXIII) 10^{-3} Mol

II. Hexahydro-s-triazine

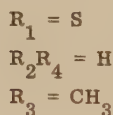
In diesem Abschnitt wird die Frage geprüft, ob polyfunktionelle zyklische N-Manich-Basen aus der Klasse der Hexahydro-s-triazine ähnliche tumorhemmende Eigenschaften wie Trihydroxymethyl-melamin (XX) besitzen.

Folgende Verbindungen wurden für diese Untersuchungen herangezogen:

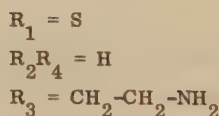
... Hexahydro-s-triazin



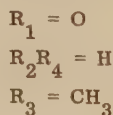
XXVII 1-Thio-4-methyl-... (77)



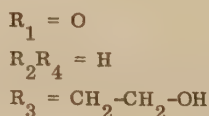
XXVIII 1-Thio-4-(β -aminoäthyl)-... (77)



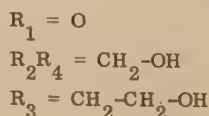
XXX 1-Keto-4-methyl-... (77)



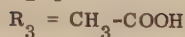
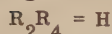
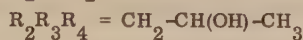
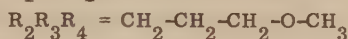
XXX 1-Keto-4-(β -hydroxyäthyl)-... (77)



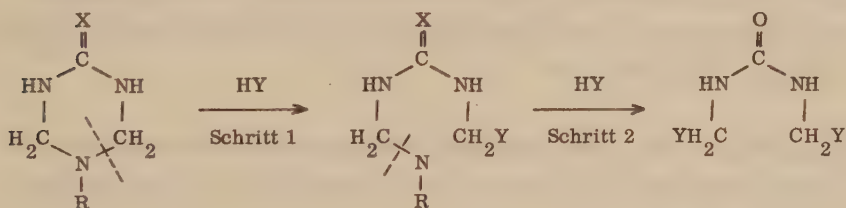
XXXI 1-Keto-4-(β -hydroxyäthyl)-2,6-dihydroxymethyl-...



XXXII 1-Keto-4-essigsäure-...

XXXIII 2,4,6-Tri-(β -hydroxyäthyl)-...XXXIV 2,4,6-Tri-(β -hydroxypropyl)-...XXXV 2,4,6-Tri-(γ -methoxypropyl)-...

Neben ihren polyfunktionellen Eigenschaften empfiehlt sich diese Verbindungsklasse für Vergleichsuntersuchungen mit Trihydroxymethyl-melamin (XX), da die Carbonyl- bzw. Thionyl-haltigen Stoffe XXVII-XXXII der Verbindung XX ähnliche Stabilitäts- und Alkylierungseigenschaften, d. h. eine in 2 Schritten ablaufende Reaktion des Hexahydro-s-triazin-Ringes, erwarten lassen:



Dieser Effekt kann möglicherweise durch Einbau von Hydroxymethylgruppen (XXXI) erhöht werden. Für die Verbindungen XXXIII-XXXV ist aufgrund der fehlenden Carbonyl- bzw. Thionylgruppe im Ring eine geringe Stabilität und entsprechende hohe Reaktivität anzunehmen.

Aus der Literatur liegen über antimikrobielle und tumorhemmende Effekte dieser Verbindungsklasse keinerlei Angaben vor. Synthetisch wurden die Hexahydro-s-triazine von Paquin (77) untersucht. Die Verbindungen XXXI-XXXV wurden analog hergestellt.

Prüfung auf tumorhemmende und antimikrobielle Wirkung

Ähnlich wie bei Schönenberger et al. (85) wurden mit den polyfunktionellen Hexahydro-s-triazinen am Yoshida-Sarkom Wachstumshemmungen bis zu 55% erreicht (Tab. 24). Sogar an dem schwer ansprechbaren Sarkom 180 der Maus konnten Hemmungen von maximal 58% erzielt werden (Tab. 23). Verbindungen, die eine Carbonyl- bzw. Thionylgruppe enthalten (XXVII-XXXII), zeigen eine geringe Wachstumshemmung am Yoshida-Sarkom. Die Verbindungen XXXIII-XXXV rufen trotz ihrer Instabilität eine gute Wachstumshemmung an diesem Tumormodell hervor. Die am Yoshida-Sarkom beobachteten Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung sind am Sarkom 180 nicht erkennbar.

Ähnlich wie an den beiden Impftumoren spiegeln sich auch in der Toxizität Beziehungen zwischen Stabilität und Wirkung wider (Tab. 22).

Im Gegensatz zu den Heilerfolgen mit Trihydroxymethyl-melamin (XX) war die Wachstumshemmung der mit Hexahydro-s-triazinen behandelten Tiere zeitlich begrenzt. Die Lebensdauer der Tiere wurde nicht verlängert. Das ursprüngliche Ziel, Substanzen mit einer der Verbindung XX analogen tumorhemmenden Wirkung zu finden, wurde nicht erreicht.

Bezüglich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften entsprechen die Hexahydro-s-triazine im wesentlichen denen von XX; sie sind gegen Pilze und Bakterien gleich wirksam (Tab. 25).

Prüfung auf Stabilität

Über das Stabilitätsverhalten der Hexahydro-s-triazine unter physiologischen Bedingungen liegen keine Angaben vor. Man weiß lediglich, daß sie unter Säurezusatz in ihre Ausgangsprodukte zerfallen (77). Wir untersuchten die Stabilität mit der Cysteinmethode (52). Die stabilen Verbindungen XXVII und XXIX waren unwirksam. Die reaktiven Verbindungen XXXII-XXXV (Tab. 26) zeigten eine Wirkung an beiden Tumoren. Quantitative Zusammenhänge zwischen Struktur und Stabilität konnten nicht beobachtet werden.

Von einer Prüfung auf aminomethylierende Eigenschaften der Hexahydro-s-triazine wurde Abstand genommen; zwischen Stabilität und Reaktivität bestehen Parallelen, wie Untersuchungen von Weitzel (84) und eigene Versuche mit der Verbindung XX (Seite 89) zeigen.

Tabelle 22: Toxizität der Hexahydro-s-triazine bei ip. Applikation an Ratte und Maus

Substanz Nr. ⁺		XXVII	XXVIII	XXIX	XXX	XXXI	XXXII	XXXIII	XXXIV	XXXV
DL ₅₀₍₁₎ mg/kg	Ratte	6.250	150	5.600	5.100	1.150	2.150	65	80	65
	Maus	8.000	300	7.500	6.500	1.450	2.450	65	75	60

+ als 10%ige wäßrige Lösung appliziert

Tabelle 23: Prüfung der Hexahydro-s-triazine am Sarkom 180 der Maus

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumorgewicht ⁺		Wachstumshemmung in % ⁺	Signifikanz ⁺ + -
	mg/kg	%DL ₅₀₍₁₎	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
XXVII	10.000	125	5	17	18	0,85	1,06	20	-
XXVIII	400	135	4	18	18	0,44	1,06	58	+
XXIX	10.000	134	5	15	18	0,87	1,06	17	-
XXX	10.000	154	5	20	18	0,56	1,06	47	+
XXXI	1.500	131	5	17	18	0,44	1,06	58	+
XXXII	4.000	163	5	20	18	0,56	1,06	47	+
XXXIII	50	77	1	18	18	0,42	1,06	60	+
XXXIV	60	75	1	18	18	0,5	1,06	53	+
XXXV	40	83	1	18	18	0,69	1,06	35	+

+ nähere Beschreibung siehe Seite 15

Tabelle 24: Prüfung der Hexahydro-s-triazine am Yoshida-Sarkom der Ratte

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumorgewicht ⁺		Mittlere Lebens- dauer in Tagen		Wachstums- hemmung in %
	mg/kg	%DL ₅₀ (1)	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	
XXVII	10.000	160	5	4	4	13,1	13,2	21,5	22,8	-
XXVIII	300	200	6	4	4	11,8	13,1	35,7	24,2	10
XXIX	7.500	134	5	4	4	12,2	13,2	24,2	22,8	-
XXX	7.500	147	5	4	4	10,6	13,2	29,7	22,8	20
XXXI	1.000	87	5	4	4	14,6	13,1	24,5	24,2	-
XXXII	3.200	152	4	4	5	4,7	10,5	26,2	22,2	55
XXXIII	50	77	1	5	4	6,3	13,6	22,2	32,7	51
XXXIV	60	75	1	4	4	6,0	13,6	25,7	32,7	54
	60	75	1	5	5	5,7	10,5	21,6	22,2	46
XXXV	50	72	1	4	4	7,9	13,6	26,2	32,7	39

+ näheres siehe Seite 15

Teststamm	Grenzkonzentration in µg/ml									
	XXVII	XXVIII	XXIX	XXX	XXXI	XXXII	XXXIII	XXXIV	XXXV	
Microsporium audouinii (HK/1328)	250	62	>1000	250	250	250	62	31	31	
Microsporium distortum George (HK)	250	62	1000	250	250	250	62	62	31	
Microsporium canis (HK/312)	250	62	1000	250	250	250	62	62	62	
Microsporium gypseum (PI)	500	125	1000	500	500	500	125	125	125	
Microsporium gypseum (HK/CBS Bodin)	1000	125	>1000	500	500	500	125	125	125	
Microsporium gypseum (E/64801)	500	125	>1000	500	500	500	125	250	125	
Trichophyton rubrum (HK/1604)	500	250	>1000	500	250	500	62	125	125	
Trichophyton schönleinii (PI)	250	250	1000	250	125	250	125	62	62	
Trichophyton schönleinii (HK/1124)	500	62	1000	500	500	500	125	125	125	
Trichophyton mentagrophytes (PI)	500	125	>1000	500	250	500	125	125	125	
Trichophyton mentagrophytes	250	125	500	500	500	500	62	125	250	
Epidermophyton floccosum (PI/5601)	250	125	500	250	500	250	62	62	62	
Epidermophyton floccosum (HK/3766)	125	62	500	500	125	500	250	31	62	
Sporotrichon schenkii (PI)	>1000	500	>1000	1000	1000	1000	125	500	500	
Nocardia asteroides (E)	>1000	500	>1000	>1000	>1000	1000	500	500	500	
Candida albicans (E/8379-64)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Streptomyces (E)	1000	62	>1000	500	250	250	62	62	62	
Staphylococcus aureus (Test Varia)	>1000	250	—	1000	500	500	125	125	125	
Enterococcus (E 6666-65)	500	125	—	500	250	250	62	62	62	
Streptococcus pyogenes (E)	>1000	250	—	1000	500	500	125	125	125	
Escherichia coli haem. (E)	1000	250	—	500	250	—	62	62	62	
Proteus providenciae (E)	>1000	250	—	1000	500	500	125	125	125	
Pseudomonas aeruginosa (E/7250)	1000	250	—	500	500	500	125	125	62	
Salmonella typhimurium (E)	500	31	—	250	125	62	62	62	62	
Wasser Vibrionen (E)	500	250	—	500	250	500	62	62	125	
Klebsiella Pneumoniae (E 14310/66)	500	250	—	500	500	500	62	62	62	
Shigella flexneri (E/733-55 D/O BUS)	500	250	—	500	250	250	62	62	125	
Bacillus subtilis (E)	500	250	>1000	500	250	250	62	62	62	

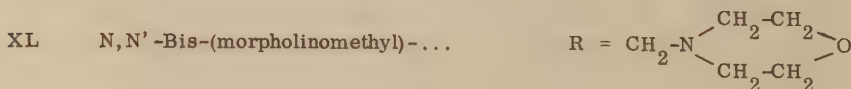
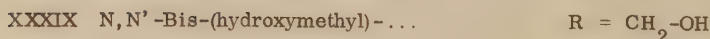
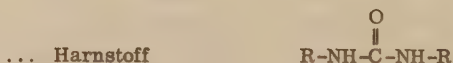
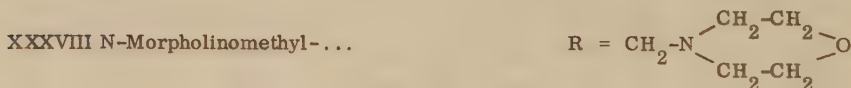
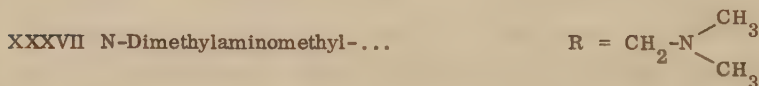
Tabelle 26: Stabilität der Hexahydro-s-triazine nach der Cystein-Methode (52)
Gesamtvolumen 50 ml. pH 7,35, 37°C

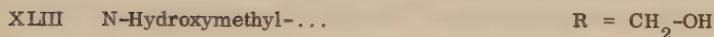
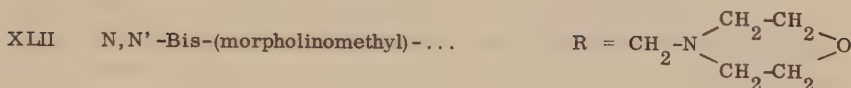
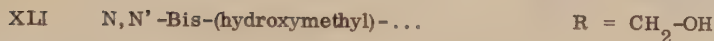
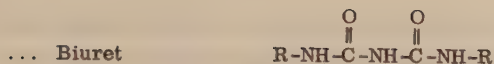
Substanz Nr.	Substanz Menge (Mol)	Hydrolyse in %		
		1 Std.	12 Std.	24 Std.
XXVII	$1,5 \times 10^{-3}$	<1	<1	<1
XXVIII	$1,5 \times 10^{-3}$	29,6	29,6	30,0
	5×10^{-4}	55,0	55,0	55,0
	2×10^{-4}	68,5	69,0	69,0
XXIX	$1,5 \times 10^{-3}$	<1	<1	<1
XXX	$1,5 \times 10^{-3}$	5,3	17,5	18,0
XXXI	$1,5 \times 10^{-3}$	15,7	24,0	24,0
	2×10^{-4}	36,2	36,2	36,2
XXXII	$1,5 \times 10^{-3}$	14,7	22,3	30,2
XXXIII	$1,5 \times 10^{-3}$	43,5	43,5	43,5
	5×10^{-4}	40,0	40,0	40,0
	2×10^{-4}	69,5	69,5	69,5
XXXIV	$1,5 \times 10^{-3}$	40,4	40,4	40,4
	2×10^{-4}	52,7	52,7	52,7
XXXV	$1,5 \times 10^{-3}$	56,0	56,0	56,0
	2×10^{-4}	93,5	93,5	93,5

III. N-Halbacetale und Aminale von Äthylurethan, Harnstoff, Biuret und Dicyandiamid

Nachdem die Versuche mit s-Triazinen und Hexahydro-s-triazinen zu keinem der Verbindung XX vergleichbaren Tumorchemotherapeuticum führten, wurden weiterhin N-Halbacetale und Aminale von Äthylurethan, Harnstoff, Biuret und Dicyandiamid in die Untersuchungen miteinbezogen. Wir erwarteten von diesen Verbindungen eine Stabilität, die zwischen den stabilen tertiären acylierten Halbacetalen und Aminen (52) und den instabilen und hochreaktiven Aminen von Aminen (85; S. 93) liegt.

Folgende Verbindungen wurden synthetisiert:





Die N-Hydroxymethyl-Verbindungen wurden analog XX (58) durch Umsetzung von Formaldehyd (35%ige wäßrige Lösung) und Amid synthetisiert. Die Darstellung der Morpholin-N-Mannich-Basen erfolgte durch Kondensation von Amid, Morpholin und Paraformaldehyd in Wasser bzw. Dioxan unter Erwärmen.

Über die tumorhemmende oder antimikrobielle Wirkung dieser Verbindungen ist, mit Ausnahme von Bis-(hydroxymethyl)-harnstoff, nichts bekannt. Diese Verbindung zeigt an Mäusen, die mit Streptococcus equi bzw. Scharlach-Streptococcen infiziert wurden, Heilerfolge (58).

Die Verbindungen XXXVI-XXXVIII können zudem als Kombination zweier Wirkprinzipien - Eigenwirkung von Äthylurethan und Aminomethylierung - aufgefaßt werden; sie sind Derivate von Äthylurethan, über dessen herbicide, carcinostatische und antileukämische Wirkung mehrfach berichtet wurde (62, 63, 69).

Analog den s-Triazin-Derivaten und den Hexahydro-s-triazinen, untersuchten wir auch an diesen Verbindungen die Zusammenhänge zwischen Stabilität, Reaktivität und tumorhemmender Wirkung.

Untersuchungen auf tumorhemmende und antimikrobielle Wirkung

Im Gegensatz zu XX besitzen die Verbindungen XXXIX-XLIV am Yoshida-Sarkom der Ratte keine tumorhemmende Wirkung. Eine Ausnahme bilden die Äthylurethan-Aminale XXXVII und XXXVIII, deren schwache Wirkung möglicherweise auf einer Abspaltung von Äthylurethan beruht (62). Wie ein Parallelversuch zeigt, ruft Äthylurethan mit einer Dosis von 1.000 mg/kg eine Tumorstillstandshemmung von 67% hervor (Tab. 29).

Dieses Ergebnis schließt die Amidomethylierung als Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen praktisch aus.

Die Sarkom-180-Versuche bestätigen die am Yoshida-Sarkom mit diesen Verbindungen gemachten Beobachtungen. Die Verbindungen XXXVI-XXXVIII zeigen aufgrund der Eigenwirkung von Äthylurethan einen tumorhemmenden Effekt, während die restlichen Verbindungen eine geringe bzw. keine Wirkung verursachen (Tab. 28).

Auch bezüglich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften sind diese Verbindungen uninteressant. Ihre schwach wachstumshemmende Wirkung ist möglicherweise abgespaltenem Formaldehyd zuzuordnen.

Tabelle 27: Akute Toxizität der Verbindungen XXXVI-XLIV durch ip. Applikation an Ratte und Maus

Substanz Nr. ¹		XXXVI	XXXVII	XXXVIII	XXXIX	XL	XLI	XLII	XLIII	XLIV	+
DL ₅₀₍₁₎ mg/kg	Ratte	1.200	500	300	2.200	1.900	4.750	3.000	1.750	300	1.400
	Maus	1.200	600	500	2.400	1.200	5.000	5.000	2.100	400	1.400

+ Äthylurethan
++ als 10%ige wäßrige Lösung appliziert

Tabelle 28: Prüfung der Verbindungen XXXVI-XLIV am Sarkom 180 der Maus

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumorgewicht ⁺		Wachstumshemmung in % ⁺	Signifikanz ⁺ + -
	mg/kg	% DL ₅₀₍₁₎	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.		
XXXVI	3.200	260	8	20	19	0,52	1,04	50	+
XXXVII	500	83	5	17	17	0,4	0,94	57	+
XXXVIII	250	50	5	19	17	0,6	0,94	36	+
XXXIX	2.500	104	5	17	17	0,51	0,94	36	+
XL	2.500	208	5	15	17	0,59	0,94	27	+
XLI	5.000	100	5	19	17	0,88	0,94	-	-
XLII	8.000	160	8	19	19	0,76	1,04	27	-
XLIII	4.000	190	5	19	19	0,93	0,94	-	-
XLIV	1.200	85	5	18	19	0,61	1,04	31	-
++	1.750	125	5	18	17	0,51	0,94	46	+

+ nähere Angaben siehe Seite 15
++ Äthylurethan

Tabelle 29: Prüfung der Verbindungen XXVIII-XXXV am Yoshida-Sarkom der Ratte

Substanz Nr.	Gesamtdosis			Tierzahl		Tumorgewicht ⁺		Mittlere Lebens- dauer in Tagen ⁺		Wachstums- hemmung in % ⁺
	mg/kg	% DL ₅₀ (1)	verteilt auf Tage	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	
XXVIII	350	72	5	5	5	4,8	7,9	23,0	22,2	39
XXIX	500	165	5	6	9	10,1	11,7	16,0	16,7	16
XXX	1.500	68	3	4	4	7,6	7,3	31,7	37,7	-
XXXI	1.750	92	5	4	4	11,3	15,0	25,7	24,2	-
XXXII	5.000	105	5	5	9	10,8	11,7	17,6	16,7	-
XXXIII	6.000	200	5	5	9	10,7	11,7	16,6	16,7	-
XXXIV	1.500	86	5	6	6	10,5	9,1	29,7	28,5	-
XXXV	500	167	5	5	6	10,4	9,1	21,5	28,5	-
++	1.000	71	2	5	5	2,6	7,9	24,2	22,2	67

+ nähere Angabe siehe Seite 15
++ Äthylurethan

Tabelle 30: Antimikrobielle Wirkung der Verbindungen XXXVI-XLIV

Teststamm	Grenzkonzentration in $\mu\text{g/ml}$						
	XXXVII	XXXVIII	XXXIX	XL	XLII	XLIII	XLIV
Microsporium audouinii (HK/1328)	125	125	62	125	62	62	125
Microsporium distortum George (HK)	-	-	62	125	-	-	-
Microsporium canis (HK/312)	125	250	62	125	-	-	-
Microsporium gypseum (PI)	250	250	125	250	250	250	250
Microsporium gypseum (HK/CBS Bodin)	> 1000	> 1000	125	250	250	125	250
Microsporium gypseum (E/64801)	250	250	125	250	250	250	250
Trichophyton rubrum (HK/1604)	62	250	125	250	250	250	250
Trichophyton schönleinii (PI)	250	250	62	125	125	125	125
Trichophyton schönleinii (HK/1124)	250	500	250	125	250	250	250
Trichophyton mentagrophytes (PI)	250	500	125	250	125	125	250
Trichophyton mentagrophytes (HK/1124)	250	250	125	125	500	500	500
Epidermophyton floccosum (PI)	62	62	62	125	62	125	125
Epidermophyton floccosum (HK/3766)	250	125	31	125	-	-	-
Sporotrichum schenkii (PI)	1000	> 1000	250	1000	1000	500	1000
Nocardia asteroides (PI)	1000	> 1000	250	500	500	250	250
Candida albicans (E/8379-64)	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Streptomyces (E)	500	1000	250	250	250	250	250
Staphylococcus aureus (Test Varia)	125	125	250	250	62	62	62
Enterococcus (E 6666-65)	250	500	250	250	250	250	250
Streptococcus pyogenes (E)	125	250	125	125	125	125	125
Escherichia coli haem. (E)	250	1000	250	250	500	62	250
Proteus providenciae (E)	125	250	125	125	62	62	62
Pseudomonas aeruginosa (E/7250)	500	1000	500	500	500	500	500
Salmonella typhimurium (E)	125	125	125	250	125	125	125
Wasser Vibrionen	-	-	125	125	-	-	-
Klebsiella Pneumoniae (E 14310/66)	250	250	125	250	250	125	125
Shigella flexneri (E/733-55 D/O BUS)	250	250	125	125	125	62	125
Bacillus subtilis (E)	-	-	125	250	250	125	250

Untersuchungen auf Stabilität und Reaktivität

Nach unseren bisherigen Befunden scheint das kinetische Verhalten aminomethylierender Stoffe eine wichtige Voraussetzung für das Auftreten tumorhemmender Eigenschaften zu sein. Neben Versuchen mit nucleophilen Modellsubstanzen können Stabilitätsuntersuchungen wichtige Hinweise liefern. Angesichts der Unwirksamkeit der Verbindungen XXXIX-XLIV ist ein von XX abweichendes Verhalten unter physiologischen Bedingungen zu erwarten.

Zur Klärung der Stabilitätsfrage wurde die Formaldehydbestimmungsmethode mit Cystein (52) herangezogen. Wir konnten feststellen, daß, wie bei den s-Triazinen und den Hexahydro-s-triazinen, alle Verbindungen bei pH 7, 35 und 37⁰ entweder sehr langsam oder sehr schnell zerfallen. XX nimmt dagegen eine mittlere Stellung ein, die für die Wirkung am soliden Tumor anscheinend wesentlich ist.

Die aminomethylierenden Eigenschaften der Verbindungen XXXVI-XLIV sind ihrem Stabilitätsverhalten ähnlich. Eingehend wurden die Verbindungen XX, XXXIX und XLIII bezüglich ihrer Stabilität und Umsetzung mit Morpholin in Wasser bei pH 7, 35 und 37⁰ untersucht. Aus Abb. 23 ist zu ersehen, daß XLIII Morpholin bereits nach 12 Stunden quantitativ alkyliert. XXXIX reagiert dagegen so langsam, daß Morpholin auch nach 24 Stunden erst zu 50% umgesetzt ist. Ein Vergleich des Kurvenverlaufs für beide Vorgänge, Hydrolyse und Aminomethylierung (Abb. 22 und 23), zeigt auch hier die schon beobachteten Zusammenhänge. Die Verbindung XX liegt in ihrem Reaktionsverhalten zwischen diesen beiden extremen Fällen.

Tabelle 31: Stabilität der Verbindungen XXXVI-XLIV nach der Cystein-Methode (52)
 $1,5 \times 10^{-3}$ Mol. Gesamtvolumen 50 ml. pH 7,35, 37°

Substanz Nr.	Hydrolyse in %		
	1 Stunde	12 Stunden	24 Stunden
XXXVI	-	1,9	3,4
XXXVII	48,5	48,5	48,5
XXXVIII	7,8	7,8	7,8
XXXIX	-	7,8	16,0
XL	-	3,3	7,1
XLI	2,8	8,6	14,9
XLII	5,8	14,1	15,2
XLIII	36,0	60,0 ⁺	60,0
XLIV	12,9	16,9	23,8

+ nach 3 Stunden

Diskussion

Pharmakologische und biochemische Versuchsergebnisse lassen die Annahme zu, daß die tumorhemmende Wirkung von Trihydroxymethyl-melamin (XX) auf einer Aminomethylierung biologischer Substrate beruht. Diese Eigenschaft von XX konnten wir erstmals in vitro durch Aminomethylierung von Morpholin unter physiologischen Bedingungen nachweisen (Abb. 23, Weg C). Unsere Untersuchungen mit s-Triazinkörpern, Hexahydro-s-triazinen und verschiedenen N-Halbacetalen und Aminen zeigen weiterhin, daß der Grund für die tumorhemmende Wirkung von XX in einem charakteristischen Stabilitäts- und Reaktivitätsverhalten begründet ist.

So steht das Fehlen tumorhemmender Eigenschaften bei den s-Triazin-Abkömmlingen XXI, XXIV und XXV in Beziehung zu der hohen Stabilität der Verbindungen. Ihre Unlöslichkeit ist möglicherweise ein weiterer Grund für die beobachtete Unwirksamkeit. XXII ist unter physiologischen Bedingungen ebenfalls stabil, völlig dissoziiert und vermutlich deshalb unwirksam.

Die geringe tumorhemmende Wirkung der Hexahydro-s-triazine ist damit zu erklären, daß die meisten Verbindungen dieses Typs hochreaktiv sind und ihre Fähigkeit zur Aminomethylierung bei tumorferner Applikation auf dem Weg zur Tumorzelle durch Reaktion mit unspezifischen Rezeptoren einbüßen. Durch Einführung einer Carbonyl- bzw. Thionylgruppe in den Hexahydro-s-triazin-Ring (Verb. XXVII-XXXII) konnte kein der Verbindung XX analoges mechanistisches Verhalten erreicht werden.

Unser Vorhaben, eine bezüglich Reaktivität und tumorhemmenden Eigenschaften dem Trihydroxymethyl-melamin (XX) ähnliche Substanz aufzufinden, war auch mit der Herstellung der N-Halbacetale und Amine von Äthylurethan, Harnstoff, Biuret und Dicyandiamid gescheitert. Diese Verbindungen zeigten eine gegenüber XX erhöhte oder verminderte Stabilität. Zusammenhänge zwischen Stabilität, aminomethylierenden Eigenschaften und tumorhemmender Wirkung konnten durch

einen Vergleich der N-Halbacetale XXXIX und XLIII mit XX besonders deutlich herausgearbeitet werden. Wie in den Abb. 27 und 28 dargestellt, alkyliert die instabile Verbindung XLIII Morpholin sehr schnell, während sich die stabile Verbindung XXXIX mit Morpholin nur langsam umsetzt. Bei XX liegen mit einer mittleren Zerfalls- und Alkylierungsgeschwindigkeit offensichtlich ideale Verhältnisse für eine Beeinflussung solider Tumoren vor. XXXIX und XLIII unterscheiden sich in ihren Zerfalls- und Alkylierungseigenschaften von XX lediglich in quantitativer Beziehung. Sie sind an soliden Tumoren, d. h. bei tumorferner Applikation, unwirksam.

Die geringe Wirkung von XX am Ascites-Tumor (85), die Applikation erfolgt bei diesem Modell intratumoral, erklärt sich mit ihrer niedrigeren Reaktivität. Die hochreaktiven α -Aminoalkylantien bewirken bei dieser Applikationsform dagegen eine wesentlich bessere Wachstumshemmung (84, 85).

Die geringe antimikrobielle Wirkung von XX weist ebenfalls in die Richtung einer verringerten Reaktivität.

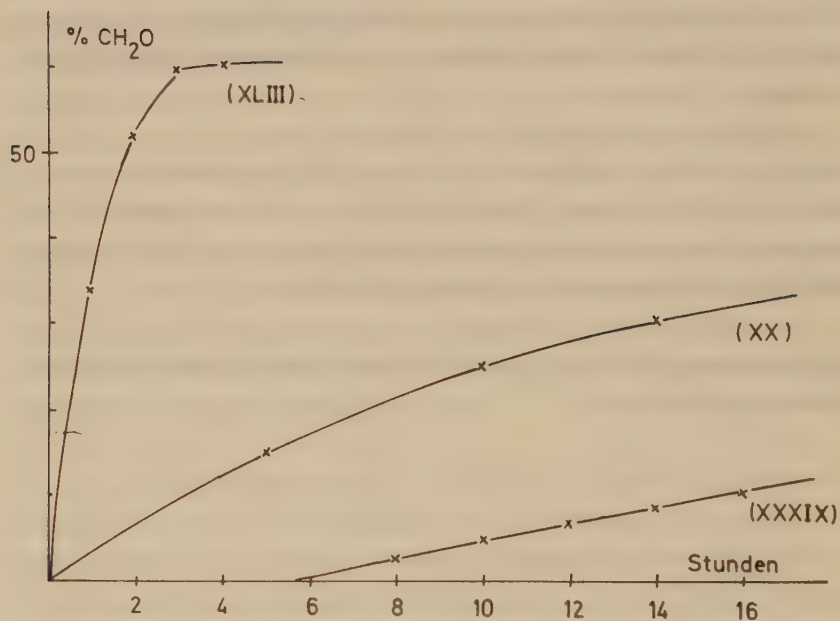


Abbildung 27: Formaldehydabspaltung von Trihydroxymethyl-melamin (XX)
 Hydroxymethyl-dicyandiamid (XLIII)
 Bis-(hydroxymethyl)-harnstoff (XXXIX)

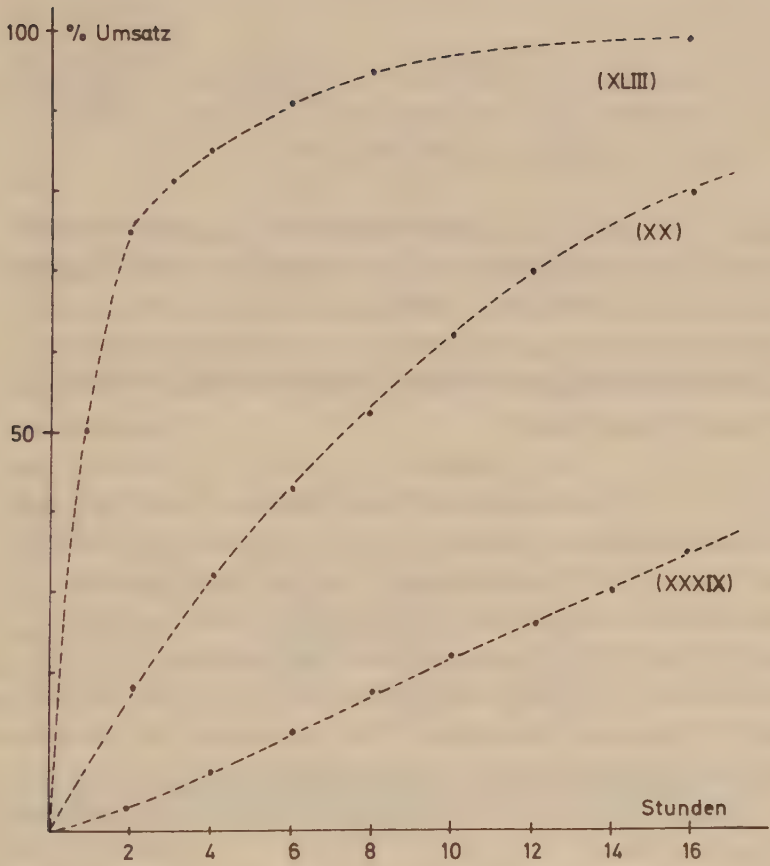


Abbildung 28: Aminomethylierung von Morpholin durch
 Trihydroxymethyl-melamin (XX)
 Hydroxymethyl-dicyandiamid (XLIII)
 Bis-(hydroxymethyl)-harnstoff (XXXIX)

E. Experimenteller Teil

I. Synthese der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene und der 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane

Verfahren 1: Ein Gemisch aus 0,01 Mol Stilböstrol bzw. Hexöstrol, 0,02 Mol Amin und 0,02 Mol Paraformaldehyd wird in 20 ml Dioxan bzw. Äthanol unter Rühren 60 Minuten am Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen, der Rückstand in 2n-Salzsäure aufgenommen. Nach Neutralisation mit Kaliumkarbonat wird das ausgefallene Rohprodukt abgenutscht und durch Kristallisation gereinigt (Äthanol/Wasser).

Verfahren 2: 0,02 g-Atom metallisches Natrium werden in 100 ml Äthanol gegeben und nach Beendigung der Umsetzung mit 0,01 Mol Stilböstrol bzw. Hexöstrol versetzt. Äthanol wird im Vakuum abgezogen, das Dinatriumsalz getrocknet. Zu der Suspension von 0,01 Mol Stilböstrol- bzw. Hexöstrol-Dinatrium in 20 ml Acetonitril werden 0,02 Mol des entsprechenden Chlormethylamins⁺ in 20 ml Acetonitril gegeben. Das Gemisch wird 60 Minuten bei 50-60° gehalten und anschließend 30 Minuten am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand mit Wasser ausgewaschen und mit Äther extrahiert. Das nach Abziehen des Äthers verbleibende Rohprodukt wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert.

+ Zur Herstellung der Chlormethylamin-Derivate siehe (49)

3,3'-Bis-(dimethylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (I)

nach Verfahren 1

Schmp 137-140⁰. hRf 58. Ausbeute 52% $C_{24}H_{34}N_2O_2$ (382,5)

Ber.: C 75,39 H 8,90 N 7,32

Gef.: C 75,31 H 8,96 N 7,44

Dihydrochlorid: Schmp 245-250⁰ (Z) $C_{24}H_{36}N_2O_2Cl_2$ (455,4) Ber.: Cl 15,57

Gef.: Cl 15,77

3,3'-Bis-(diäthylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (II)

nach Verfahren 2

Schmp 109-112⁰. hRf 65. Ausbeute 34,2% $C_{28}H_{42}N_2O_2$ (438,6)

Ber.: C 76,71 H 9,58 N 6,39

Gef.: C 76,43 H 9,64 N 6,41

Dihydrochlorid: Schmp 233-235⁰ (Z) $C_{28}H_{44}N_2O_2Cl_2$ (511,2) Ber.: Cl 13,86

Gef.: Cl 13,51

3,3'-Bis-(pyrrolidino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (III)

nach Verfahren 2

Schmp 149-150⁰. hRf 38. Ausbeute 64% $C_{28}H_{38}N_2O_2$ (434,5)

Ber.: C 77,42 H 8,75 N 6,45

Gef.: C 77,21 H 8,91 N 6,31

Dihydrochlorid: Schmp 256-258⁰ (Z) $C_{28}H_{40}N_2O_2Cl_2$ (507,4) Ber.: Cl 13,97

Gef.: Cl 13,63

3,3'-Bis-(piperidino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (IV)

nach Verfahren 2

Schmp 174-177⁰. hRf 78. Ausbeute 52% $C_{30}H_{42}N_2O_2$ (462,6)

Ber.: C 77,92 H 9,09 N 6,06

Gef.: C 77,55 H 9,30 N 6,02

Dihydrochlorid: Schmp 256-258⁰ (Z) $C_{30}H_{44}N_2O_2Cl_2$ (535,5) Ber.: Cl 12,99

Gef.: Cl 12,67

3,4-Bis-(3'-dimethylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (V)

nach Verfahren 1

Schmp 147-152⁰. hRf 42. Ausbeute 52% $C_{24}H_{36}N_2O_2$ (384,5)

Ber.: C 75,00 H 9,37 N 7,29

Gef.: C 74,77 H 9,54 N 7,23

Dihydrochlorid: Schmp 245-247⁰ (Z) $C_{24}H_{38}N_2O_2Cl_2$ (457,4) Ber.: Cl 15,86

Gef.: Cl 15,47

3,4-Bis-(3'-diäthylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (VI)

nach Verfahren 2

Schmp 110-114⁰. hRf 58. Ausbeute 50% $C_{28}H_{44}N_2O_2$ (440,6)

Ber.: C 76,36 H 10,00 N 6,36

Gef.: C 76,10 H 10,00 N 6,41

Dihydrochlorid: Schmp 235-238⁰ (Z) $C_{28}H_{46}N_2O_2Cl_2$ (513,5) Ber.: Cl 13,55

Gef.: Cl 13,21

3, 4-Bis-(3'-pyrrolidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (VII)

nach Verfahren 2

Schmp 151-153⁰. hRf 32. Ausbeute 59,5% $C_{28}H_{40}N_2O_2$ (436, 6)

Ber.: C 77,06 H 9,15 N 6,41

Gef.: C 77,60 H 9,19 N 6,26

Dihydrochlorid: Schmp 245-248⁰ (Z) $C_{28}H_{42}N_2O_2Cl_2$ (509, 5) Ber.: Cl 13,92

Gef.: Cl 13,57

3, 4-Bis-(3'-piperidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (VIII)

nach Verfahren 2

Schmp 179-180⁰. hRf 78. Ausbeute 47,5% $C_{30}H_{44}N_2O_2$ (464, 6)

Ber.: C 77,58 H 9,48 N 6,03

Gef.: C 77,35 H 9,61 N 5,90

Dihydrochlorid: Schmp 255-260⁰ (Z) $C_{30}H_{46}N_2O_2Cl_2$ (537, 5) Ber.: Cl 13,19

Gef.: Cl 12,86

3-(4'-Hydroxy-phenyl)-4-(3'-piperidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan

nach Verfahren 1 mit äquimolaren Mengen der Ausgangsprodukte

Schmp 174-176⁰. hRf 62. Ausbeute 22% $C_{24}H_{33}NO_2$ (367, 5)

Ber.: C 78,47 H 9,00 N 3,81

Gef.: C 78,68 H 9,13 N 3,87

II. Synthese der N-Lost-N-Mannich-Basen

Die Kondensation von Nor-Lost mit der NH-aciden Komponente erfolgt über Hydroxymethyl-bis-(2-chloräthyl)-amin (siehe dazu (60)):

0,1 Mol Bis-(2-chloräthyl)-amin-hydrochlorid wird in eiskaltem Wasser gelöst und mit kalter Sodalösung alkalisiert. Die Temperatur soll dabei unter 5° liegen. Die ausgeschiedene Base wird in eisgekühltem Äther aufgenommen. Die wäßrige Phase wird zweimal mit Äther durchgeschüttelt, die ätherischen Lösungen werden vereinigt und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird bei 5° abgezogen. Unter Kühlen und Umschwenken werden 0,11 Mol Formaldehyd (35%ige Lösung) zu der Nor-Lost-Base gegeben. Dieses Gemisch wird in 20 ml Äthanol gelöst. Unter Rühren und Kühlen auf 5° werden äquivalente Mengen der äthanollöslichen NH-aciden Komponente zugefügt. Nach etwa 30 Minuten wird Äthanol im Vakuum abgezogen und das Rohprodukt durch mehrmaliges Umkristallisieren gereinigt.

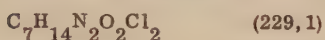
Die nicht kristallisierenden Verbindungen XI, XII und XIII werden durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt. Dazu wird der nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibende ölige Rückstand in Äther aufgenommen und mit Wasser mehrmals durchgeschüttelt. 200 mg der vom Äther befreiten Substanz werden in 5 ml Äthanol gelöst. Die Lösung wird mit der Desaga-Spritzpistole auf Kieselgel GF_{254} beschichtete Glasplatten vom Format 40 x 20 aufgetragen. Als Fließmittel findet Chloroform:Cyclohexan:Methanol: NH_3 -gesättigtes Chloroform (50:40:10:10) Verwendung. Der hRf -Wert-Bereich 75 - 85 des Chromatogramms enthält die gereinigte Substanz und kann im UV-Licht (Verb. XIV) bzw. durch Besprühen kleiner Streifen am Chromatogramm mit Jod-Jodkali (Verb. XI, XII und XIII) abgegrenzt werden. Das substanzhaltige Kieselgel wird abgeschabt, mit absolutem Äther extrahiert und die filtrierte Lösung i. V. eingedampft.

Herstellung der Kieselgel-Platten:

Glasplatten 40 x 20 werden mit Kieselgel GF²⁵⁴ Merck unter Verwendung des Desaga-Streichgeräts beschichtet. Für jede Platte wird eine Suspension von 120,0 g Kieselgel in 250 ml Wasser benutzt. Schichtdicke: 2 mm. Die Platten werden über Nacht an der Luft und anschließend bei 50–60° getrocknet.

N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-methyllurethan (IX)

Schmp 43° (Äthanol). hRf 82. Ausbeute 41%

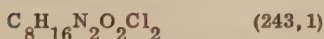


Ber.: C 36,67 H 6,11 N 12,22 Cl 31,00

Gef.: C 36,39 H 6,20 N 12,30 Cl 31,00

N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-äthylurethan (X)

Schmp 47° (Äthanol/Wasser). hRf 83. Ausbeute 63,5%



Ber.: C 39,50 H 6,59 N 11,52 Cl 29,21

Gef.: C 39,40 H 6,74 N 11,55 Cl 28,99

N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-isopropylurethan (XI)

Öl. hRf 82. Ausbeute 39,9%

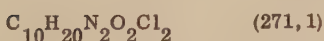


Ber.: C 42,02 H 7,00 N 10,85 Cl 27,62

Gef.: C 42,30 H 7,20 N 10,70 Cl 27,12

N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-isobutylurethan (XII)

Öl. hRf 82. Ausbeute 49,4%



Ber.: C 44,28 H 7,38 N 10,33 Cl 26,19

Gef.: C 44,52 H 7,52 N 10,28 Cl 25,96

N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzylurethan (XIII)

Öl. hRf 80. Ausbeute 46,5 %

 $C_{13}H_{18}N_2O_2Cl_2$ (305,1)

Ber.: C 51,14 H 5,90 N 9,18 Cl 23,27

Gef.: C 51,51 H 6,10 N 9,04 Cl 22,84

N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-phenylurethan (XIV)

Schmp 88° (Äthanol/Wasser). hRf 78. Ausbeute 30 % $C_{12}H_{16}N_2O_2Cl_2$ (291,2)

Ber.: C 49,48 H 5,49 N 9,62 Cl 24,39

Gef.: C 49,50 H 5,56 N 9,57 Cl 24,40

N,N'-Di-[bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-harnstoff (XV)

Schmp 89° (Äther). Ausbeute 84,5 % $C_{11}H_{22}N_4OCl_4$ (368,1)

Ber.: C 35,86 H 5,90 N 15,22 Cl 38,58

Gef.: C 36,02 H 5,83 N 15,05 Cl 38,05

III. Synthese der s-Triazin-Derivate

Die Verbindungen XX-XXV wurden nach bekannten Vorschriften hergestellt (58).

N,N',N''-Tris-(morpholinomethyl)-melamin (XXVI)

0,1 Mol Melamin, 0,33 Mol Paraformaldehyd und 0,33 Mol Morpholin werden in 100 ml Wasser bei 50 - 60° 1 Stunde gerührt. Das Wasser wird im Vakuum abgezogen und der Rückstand umkristallisiert.

Schmp 110° (Äther/Wasser). hRf 42. Ausbeute 85%

$C_{18}H_{33}N_9O_3$ (423,4)

Ber.: C 51,06 H 7,80 N 29,55

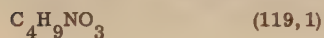
Gef.: C 50,86 H 7,78 N 29,61

IV. Synthese der N-Halbacetale und Aminale von Äthylurethan, Harnstoff, Biuret und Dicyandiamid

N-Hydroxymethyl-äthylurethan (XXXVI) (52)

0,1 Mol Äthylurethan wird in 20 ml Dioxan gelöst und mit 0,1 Mol getrockneten Natriumkarbonats versetzt. Unter Rühren und Kühlen wird dem Gemisch langsam 0,1 Mol Formaldehyd (35%ige wäßrige Lösung) zugefügt. Das Karbonat wird abfiltriert, das Dioxan im Vakuum abgezogen und der Rückstand umkristallisiert.

Schmp 53° (Petroläther/Äther). Ausbeute 31,8%



Ber.: C 40,30 H 7,61 N 11,79

Gef.: C 40,65 H 7,43 N 11,79

N,N-Dimethylaminomethyl-äthylurethan (XXXVII)

analog XXVI

Sdp $_{0,1}$ $68-70^{\circ}$. Ausbeute 35%



Ber.: C 48,00 H 9,33 N 18,66

Gef.: C 47,82 H 9,04 N 18,60

N-Morpholinomethyl-äthylurethan (XXXVIII)

analog XXVI

Sdp $_{0,1}$ $100-110^{\circ}$. Ausbeute 45,5%



Ber.: C 51,07 H 8,51 N 14,88

Gef.: C 51,83 H 8,84 N 14,95

N,N'-Bis-(hydroxymethyl)-harnstoff (XXXIX) (78)

Man gibt 0,1 Mol Harnstoff zu 0,2 Mol Formaldehyd (35%ige wäßrige Lösung) und stellt die Lösung mit sekundärem Natriumphosphat auf pH 8-9 ein. Die Reaktionstemperatur wird 1 Stunde bei 15-25° gehalten. Der Ansatz wird über Nacht stehengelassen, das auskristallisierte Rohprodukt abgenutscht und umkristallisiert.

Schmp 126° (Äthanol). Ausbeute 41%

$C_3H_8N_2O_3$ (120,1)

Ber.: C 30,00 H 6,67 N 23,33

Gef.: C 30,20 H 6,62 N 23,20

N,N'-Bis-(morpholinomethyl)-harnstoff (XL) (79)

0,1 Mol Harnstoff und 0,2 Morpholin werden in 100 ml Dioxan zum Sieden erhitzt. Unter Rühren am Rückfluß werden portionsweise 0,2 Mol Paraformaldehyd zugesetzt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird das Rohprodukt abgenutscht und umkristallisiert.

Schmp 190° Ausbeute 87%

$C_{11}H_{22}N_4O_3$ (258,3)

Ber.: C 51,00 H 8,50 N 21,70

Gef.: C 50,72 H 8,49 N 22,09

N,N'-Bis-(hydroxymethyl)-biuret (XLI)

0,1 Mol Biuret wird zu 0,2 Mol Formaldehyd-Lösung (35%), die mit Bicarbonat auf pH 8-9 eingestellt ist, gegeben. Das Gemisch wird 30 Minuten unter Rühren auf 80° erwärmt, wobei Lösung eintritt. Beim Erkalten kristallisiert das Rohprodukt aus.

Schmp 115° (Wasser). Ausbeute 63%

$C_4H_9N_3O_3$ (163,1)

Ber.: C 29,40 H 5,52 N 25,80

Gef.: C 29,30 H 5,58 N 25,70

N,N'-Bis-(morpholinomethyl)-biuret (XLII)

analog XXVI

Schmp 147° (Äthanol/Aceton). Ausbeute 89%

$$\text{C}_{12}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_4 \quad (311, 3)$$

Ber.: C 47,84 H 7,64 N 23,25

Gef.: C 47,75 H 7,67 N 23,14

N-Hydroxymethyl-dicyandiamid (XLIII)

analog XLI

Schmp 115-117°. Ausbeute 85%

$$\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_4\text{O} \quad (114, 1)$$

Ber.: C 34,05 H 4,96 N 49,64

Gef.: C 33,33 H 5,20 N 50,10

N-Morpholinomethyl-dicyandiamid (XLIV)

analog XXVI

Schmp 137° (Äthanol/Aceton). hRf 64. Ausbeute 85%

$$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O} \quad (183, 2)$$

Ber.: C 45,90 H 7,10 N 38,20

Gef.: C 45,85 H 7,19 N 38,29

V. Synthese der Hexahydro-s-triazine

1-Thio-4-methyl-hexahydro-s-triazin (XXVII) (77)

0,1 Mol Thioharnstoff wird in 50 ml Wasser gelöst und mit 0,1 Mol Methylamin (33%ige wäßrige Lösung) versetzt. Unter Rühren und Kühlen bei 10 - 15° werden 0,2 Mol Formaldehyd (35%ige wäßrige Lösung) tropfenweise eingetragen. Eine Stunde wird bei Zimmertemperatur gerührt. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft.

Schmp 169° (Benzol). Ausbeute 88%

$C_4H_9N_3S$ (131, 2)

Ber.: C 36,60 H 6,85 N 32,00 S 24,40

Gef.: C 36,40 H 7,00 N 31,50 S 24,60

1-Thio-4-(β -aminoäthyl)-hexahydro-s-triazin (XXVIII) (77)

0,1 Mol Thioharnstoff wird in 200 ml Wasser gelöst und 0,1 Mol Äthylendiamin zugesetzt. Unter Rühren und Kühlen bei 10 - 15° werden 0,2 Mol Formaldehyd (35%ige wäßrige Lösung) eingetragen. Die Lösung trübt sich unter Abscheidung des Hexahydrotriazins. Nach einstündigem Rühren wird eingedampft und umkristallisiert.

Schmp 140° (Wasser). Ausbeute 94%

$C_5H_{15}N_4S$ (163, 2)

Ber.: C 37,30 H 7,50 N 35,00 S 20,00

Gef.: C 37,50 H 7,29 N 34,94 S 19,85

1-Keto-4-methyl-hexahydro-s-triazin (XXIX) (77)

analog XXVII

Schmp 200° (Benzol). Ausbeute 91%

$C_4H_9N_3O$ (115, 1)

Ber.: C 41,00 H 7,70 N 35,90

Gef.: C 41,10 H 8,00 N 35,90

1-Keto-4-(β -hydroxyäthyl)-hexahydro-s-triazin (XXX) (77)

analog XXVII

Harzartige Masse. Ausbeute 88%

 $C_5H_{11}N_3O_2$ (145, 1)

Ber.: C 41,30 H 7,59 N 29,00

Gef.: C 40,47 H 7,42 N 27,96

1-Keto-4-(β -hydroxyäthyl)-2,6-dihydroxymethyl-hexahydro-s-triazin (XXXI)

Zu 0,1 Mol XXVII in 100 ml Wasser werden 5,0 g 48%ige Kalilauge und bei Temperaturen unter 50° 0,22 Mol Paraformaldehyd gegeben. Nach eintätigem Stehen zieht man das Lösungsmittel ab.

Harzartige Masse. Ausbeute 82%

 $C_7H_{15}N_3O_4$ (205, 2)

Ber.: C 41,00 H 7,31 N 20,50

Gef.: C 39,46 H 6,88 N 18,70

1-Keto-hexahydro-s-triazin-4-essigsäure (XXXII)

analog XXVII

Hygroskopisches Pulver. Schmp 45°. Ausbeute 81%

 $C_5H_9N_3O_3$ (159, 1)

Ber.: C 37,80 H 5,55 N 26,50

Gef.: C 36,80 H 5,69 N 25,80

2, 4, 6-Tri-(β -hydroxyäthyl) -hexahydro-s-triazin (XXXIII)

0,1 Mol Äthanolamin wird in 50 ml Wasser gelöst und unter starkem Rühren mit äquimolaren Mengen Paraformaldehyd portionsweise versetzt. Die Reaktionstemperatur wird so reguliert, daß sie 80 - 90° nicht überschreitet. Nach 2 Stunden Rühren wird im Vakuum eingedampft.

Sdp_{0,1} 60°. Ausbeute 69%

$C_{21}H_{21}N_3O_3$ (219, 2)

Ber.: C 49,35 H 9,60 N 19,15

Gef.: C 49,03 H 9,45 N 18,95

2, 4, 6-Tri-(β -hydroxypropyl) -hexahydro-s-triazin (XXXIV)

analog XXXIII

Sdp_{0,1} 70-75°. Ausbeute 66,5%

$C_{27}H_{27}N_3O_6$ (309, 3)

Ber.: C 55,30 H 10,30 N 16,10

Gef.: C 55,30 H 10,40 N 15,56

2, 4, 6-Tri-(methoxypropyl) -hexahydro-s-triazin (XXXV)

analog XXXIII

Zähflüssiges Öl. Ausbeute 64%

$C_{33}H_{33}N_3O_3$ (303, 4)

Ber.: C 59,40 H 10,90 N 13,85

Gef.: C 59,27 H 10,63 N 14,26

VI. Ermittlung der physikalisch-chemischen Daten

1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die scheinbaren Dissoziationskonstanten ($p'K_a$) wurden aus den Titrationskurven durch Ermittlung der pH-Werte am Halbneutralisationspunkt bestimmt.

Die Titrationskurven wurden an der Geräteordnung Titrigraph SBR 2, Titrator TTT 1 und Autobürette ABU 1 der Firma Radiometer aufgenommen.

Die Titration erfolgte an 10^{-4} molaren Lösungen der Dihydrochloride (Verbindung I-VIII) unter N_2 -Begasung und Rühren bei $20^{\circ} \pm 1$ unter Verwendung einer Glaselektrode und einer Kalomelektrode als Bezugsselektrode. Die Ionenstärke der Lösungen wurde mit KCl auf $0,1 \mu$ eingestellt.

Da die Basen in Wasser unlöslich sind, wurden die Titrationskurven unter Zusatz verschiedener Mengen Isopropylalkohol aufgenommen. Die erhaltenen Werte ergaben durch Extrapolation die $p'K_a$ -Werte in Wasser.

2. Bestimmung der Basenlöslichkeit (50)

Die Basenlöslichkeit wurde aus dem $p'K_a$ -Wert und dem Trübungs-pH errechnet.

Zur Bestimmung des Trübungs-pH wurden die Dihydrochlorid-Lösungen der Verbindungen I-VIII mit KCl auf eine Ionenstärke von $\mu = 0,1$ gebracht und unter N_2 -Begasung und Rühren mit CO_2 -freier $0,1\text{ n KOH}$ bis zur Trübung titriert. Zur Bestimmung diente die zur Ermittlung der $p'K_a$ -Werte verwendete Meßanordnung.

3. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten (51)

Die Verteilungskoeffizienten der Verbindungen I-VIII wurden im Lösungsmittelsystem Ligroin/Methanol/Phosphatpuffer Sörensen (82) pH 7,35 bei $20^{\circ} \pm 1$ ermittelt.

Der Gehalt an aminomethyliertem Stilböstrol bzw. Hexöstrol in organischer und wäßriger Phase wurde mit 0,01 n p-Toluolsulfonsäure in Chloroform bestimmt.

Indikator: Dimethylaminoazobenzol.

$$K = \frac{C \text{ organische Phase}}{C \text{ wäßrige Phase}}$$

VII. Chromatographische Methoden

Herstellung der Platten

Als Adsorptionsmittel wurde Kieselgel GF₂₅₄ nach Stahl (OP. Merck) verwendet. Mit Suspensionen aus Kieselgel GF₂₅₄ und destilliertem Wasser im Verhältnis 6 : 22 wurden Spiegelglasplatten vom Format 20 x 20 beschichtet. Nach Lufttrocknung wurden die Platten im Trockenschrank mindestens 5 Stunden bei 80° getrocknet.

Fließmittelsystem:

Chloroform/Cyclohexan/Methanol/NH₃-gesättigtes Chloroform (50:40:10:10).

Detektionsmittel:

1. UV₂₅₄
2. Jod-Jodkali-Lösung
3. Ninhydrin-Lösung (2 g Ninhydrin, 30 ml 20 %ige Essigsäure, 970 ml Isopropanol)

Aufgetragene Menge: 20 μ

VIII. Bestimmung von Formaldehyd und Cystein (52)

Quantitative Bestimmung von Formaldehyd

2×10^{-2} Val der N-Hydroxymethyl-Verbindung bzw. der C- oder N-Mannich-Base (entsprechend 1 Hydroxymethyl- bzw. 1 Aminomethyl-Gruppe im Molekül) werden bei pH 7,35 und 37° gehalten. Nach bestimmten Zeiten werden 25 ml ($= 5 \times 10^{-4}$ Val Hydroxymethyl- bzw. Aminomethyl-Verbindung) mit 25 ml einer 4×10^{-2} molaren wäßrigen Cysteinlösung ($= 10^{-3}$ Mol Cystein), die ebenfalls auf pH 7,35 und 37° eingestellt ist, am pH-Stat vereinigt. Der pH-Wert wird durch Zutitrieren von 0,1 n KOH konstant gehalten. Die am Ende der Umsetzung verbrauchte Menge KOH wird auf die Formaldehydmenge umgerechnet.

1 ml 0,1 n KOH = $1,305 \times 10^{-4}$ Mol Formaldehyd.

Quantitative Bestimmung des Cysteins

50 ml einer Lösung, die 5×10^{-5} Mol 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α, β -diäthylstilben- bzw. 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan-Dihydrochlorid und 2×10^{-4} Mol Cystein-Hydrochlorid enthält, werden bei pH 7,35 und 37° gelagert. Wegen der leichten Oxydierbarkeit des Cysteins muß bei diesen Versuchen unter strengstem Sauerstoffausschluß gearbeitet werden. Nach bestimmten Zeiten werden 4×10^{-4} Mol Formaldehyd hinzugefügt und der Verbrauch an 0,1 n KOH bestimmt. Unter gleichen Bedingungen werden entsprechende Kontrollversuche ohne Untersuchungssubstanz durchgeführt.

1 ml 0,1 n KOH = $1,294 \times 10^{-4}$ Mol Cystein.

IX. Quantitative Bestimmung von Formaldehyd mit Phloroglucin (76)

Die Substanz wird in Sörensenpuffer pH 7,35 gegeben, bei 37° inkubiert und zur Bestimmung vom ungelösten Anteil abfiltriert. Das Filtrat (10 ml) wird mit 1 ml Phloroglucinlösung (1%ige Phloroglucinlösung in 10% Natronlauge) versetzt. Nach 1 Minute wird die Extinktion im Eppendorf-Photometer bei 546 nm bestimmt.

Zur Ermittlung der abgespaltenen Formaldehydmengen dient eine Eichkurve.

Meßbereich: 20 µg Formaldehyd/10 ml bis 1,5 mg Formaldehyd/10 ml.

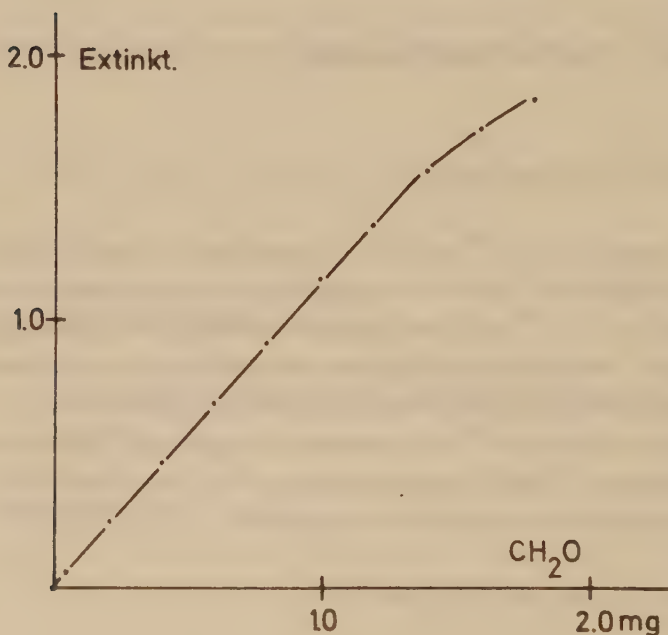


Abbildung 29: Formaldehydbestimmung mit Phloroglucin (76)
Eichkurve für Eppendorf-Photometer
2 cm Küvette, Grünfilter 546 nm

X. Messung der Cl^- -Hydrolyse

Man löst 2×10^{-4} Mol Substanz in 50 ml des gewünschten DMSO/Wasser- oder Aceton/Wasser-Gemisches. Unter Verwendung eines thermostatisierten Titrationsgefäßes wird der pH-Wert durch automatische Zugabe von 0,1 n KOH ständig konstant gehalten. Für die Aufzeichnung der Hydrolysekurve wurde die Geräteanordnung pH-Stat Fa. Radiometer benutzt.

4 ml 0,1 n KOH entsprechen einer 100 %igen Hydrolyse.

XI. Bestimmung der Reaktivität (Aminomethylierung von Morpholin)

10^{-3} Mol der entsprechenden Verbindung und 3×10^{-3} Mol Morpholin-Hydrochlorid werden in 50 ml Wasser (37°) auf pH 7,35 eingestellt. Der gewählte pH-Wert wird durch Zutitrieren von 0,1 n KOH konstant gehalten (Geräteanordnung pH-Stat Fa. Radiometer).

1 ml 0,1 n KOH = 10^{-4} Mol alkylierter Substanz.

XII. Prüfung auf tumorhemmende Wirkung

1. Bestimmung der Toxizität

Als Versuchstiere dienten erbreine männliche Mäuse der NMRI-Linie von 20 - 25 g Gewicht, sowie männliche Ratten des Stammes BD II, BD V, BD VI und BD VIII - mit einem Gewicht von 150 - 200 g.

Die mittlere letale Dosis $DL_{50(1)}$ wurde bei allen Substanzen durch einmalige im. oder ip. Gabe der frisch hergestellten wäßrigen Lösungen oder Suspensionen (pH 6,5 - 7,5) bestimmt. Wasserunlösliche Verbindungen wurden in DMSO gelöst.

Wir beobachteten die Tiere mindestens 21 Tage und sezierten nach dem Spontan-tod, um Todesursachen, wie Verletzungen etc., auszuschließen.

Die $DL_{50(1)}$ wurde jeweils aus der Regressionsgeraden im Wahrscheinlichkeits-netz ermittelt.

2. Prüfung am Yoshida-Sarkom der Ratte

Es wurden 150 - 200 g schwere männliche Ratten des Stammes BD II und BD VIII als Versuchstiere verwendet. Zur Verimpfung kam 5 - 7 Tage altes Yoshida-Ascites-Sarkom. Der Ascites wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und im Verhältnis 1:10 mit Ringerlösung DAB 6, die zusätzlich 200 mg% Glukose enthielt, verdünnt. Von dieser Verdünnung injizierten wir den Tieren jeweils 0,2 ml subkutan unter die Rückenhaut. Für jede Substanz wurden 5 - 8 Tiere und ebenso-viele Kontrolltiere verwendet. Die Therapie begann bei einem Tumorgewicht von 1 - 2 g. Die Dosierung ist den einzelnen Tabellen zu entnehmen. Das Tumorstadium wurde täglich nach Druckrey durch Anfertigen von Plastilinmodellen nach perkutanem Tastbefund ermittelt. Unter Berücksichtigung des spezifischen Gewichtes von Plastilin (1,8) ergab sich aus dem Modellgewicht das jeweilige Tumorgewicht.

Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren, wobei als Kriterien der Wirksamkeit die Hemmung des Tumorwachstums und die Lebensdauer der Tiere diente.

Als geheilt gelten Tiere, die 90 Tage nach Therapiebeginn tumorfrei sind.

3. Prüfung am Sarkom 180 der Maus

Als Versuchstiere dienten erbreine männliche Mäuse der NMRI-Linie mit einem Gewicht von 20 - 25 g. Für jede Substanz wurden 20 Mäuse und ebensoviele Kontrolltiere verwendet. Die Mäuse erhielten das Impfmateri-³al - je ein Tumorstückchen von etwa 2 mm³ - unter die rechte Flanke implantiert.

Nach 24 Stunden wurde mit der Therapie begonnen. Die Tiere erhielten mehrere ip. bzw. im. Injektionen der Substanzlösungen im Abstand von 1 - 2 Tagen.

Die Tumorgröße wurde am 11. Tag des Versuchs nach Töten der Tiere ermittelt. Die Tumoren wurden herausgeschält und gewogen.

4. Prüfung am Mammacarcinom der Sprague-Dawley-Ratte

Die Versuche wurden an Ratten vorgenommen, die eine iv. Injektion von Benzidin erhielten. Die Therapie begann, als bei den einzelnen Tieren Carcinome im Bereich der Milchdrüsen manifest wurden.

Die zu prüfenden Verbindungen wurden täglich sc. als wässrige Lösungen appliziert. Der Therapieversuch wurde auf insgesamt 4 Wochen ausgedehnt.

Die Bestimmung der Tumorzahl und -größe erfolgte einmal wöchentlich durch Anfertigen von Plastilinmodellen nach perkutanem Tastbefund (siehe Seite 132).

Die Gesamtversuchsdauer betrug etwa 100 Tage - gerechnet vom Zeitpunkt der Benzidingabe.

XIII. Prüfung am isolierten Meerschweinchenherzen nach Langendorff

Die isolierten Meerschweinchenherzen wurden von einer am Institut für Pharmakologie der Tierärztlichen Fakultät, München, entwickelten Modifikation der Langendorff-Anordnung durchströmt. Als Durchblutungsflüssigkeit diente Ringerlösung für Warmblütler (NaCl 9,5 g, KCl 0,2 g, CaCl_2 0,25 g, NaHCO_3 0,1 g, Glukose 1,0 g, Aqua dest. ad 1000 ml), die vor der Verwendung mit Sauerstoff gesättigt wurde. Die Temperatur wurde auf 37° konstant gehalten. Der Durchströmungsdruck lag zwischen 40 und 50 mm Hg. Unter diesen Bedingungen blieben die Herzen über 4–5 Stunden ansprechbar.

Registriert wurden die Kontraktionshöhe (Hubhöhe) der Ventrikel über einen Seitenschreibhebel (Übers. 1:5) auf einer Rußtrommel, dazu mit Hilfe eines Tropenzählers über einen Ordinatenschreiber die jeweilige coronare Durchflußmenge. Die Frequenz wurde in entsprechenden Zeitintervallen mittels Stoppuhr gezählt. Vor Versuchsbeginn wurden die Herzen jeweils eine halbe Stunde lang beobachtet, bis die Kontraktionshöhe und die Frequenz sich konstant verhielten. Die Präparation erfolgte nach Hildebrandt (53). Vor der Loslösung aus dem Körper wurde das Herz durch Einbinden einer Kanüle in die Vena cava cardialis mit körperwarmer Ringerlösung durchspült, so daß keine Blutrückstände die anschließende Durchströmung behindern konnten.

XIV. Methodik der mikrobiologischen Testung

1. Nährmedium

Das Nährmedium der folgenden Zusammensetzung ist für Pilze und Bakterien geeignet (95):

20,0 g	Glukose
10,0 g	Pepton e carne (Merck)
1,0 g	Hefeextrakt
5,0 g	Natriumchlorid
20,0 g	Agar
1000,0 g	Aqua dest.

Es wurde für die Testung auf Fungistase und Bakteriostase benutzt. Der Nährboden wurde mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH = 7,0 eingestellt.

2. Testung auf Fungistase

Als Testmethode wurde der Plattenmischtest verwendet (96). Die Verbindungen wurden in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor $1/2$ von $1000 \mu\text{g}$ bis $32 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Wasserunlösliche Stoffe wurden in 2 ml Äthanol oder Dimethylformamid gelöst. Die Verdünnungsreihen wurden mit verflüssigtem (40°), sterilisiertem Nährboden hergestellt.

Nach Überprüfung der Sterilität wurden die Suspensionen der Pilzstämmen überimpft. Sie wurden durch Aufschwemmen einer 7 Tage alten Sabouraud-Schrägalagarkultur, die bei 30° angezüchtet war, mit 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gewonnen. Die Hälfte einer Testplatte wurde mit 0,02 ml der Keimsuspension beimpft. Der Vergleich erfolgte mit Kontrollplatten ohne Substanzzusatz. Bebrütet wurde bei 30° . Ablesung und Vergleich mit den Kontrollplatten wurde in regelmäßigen Abständen erstmals nach 2 Tagen, dann täglich bis zum 15. Tag vorgenommen.

3. Testung auf Bakterios-tase

Die Prüfung auf Bakterios-tase wurde ebenfalls mit dem Plattenmischverfahren durchgeführt. Zur Anzüchtung der Bakterien übertrugen wir die Keime von Schrägagarröhrchen auf Pepton-Nährbouillon und bebrüteten sie 20 Stunden bei 37°. Zur Überimpfung kamen auf den 6. Teil einer Testplatte 0,01 ml einer mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:100 verdünnten Bakteriennährlösung. Die Bebrütung erfolgte bei 37°. Das Wachstum der Bakterien verglichen wir ebenfalls mit Kontrollplatten, die keine Testsubstanzen enthielten. Die Able-sung erfolgte nach 24 und 48 Stunden.

Die in den Tabellen aufgeführten Werte stellen die Grenzkonzentrationen für die absolute Wachstumshemmung dar.

F. Zusammenfassung

3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene und 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane besitzen eine spezifische tumorhemmende Wirkung am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Sprague-Dawley-Ratte.

Die für diese Verbindungsklassen ursprünglich angenommene Wirkungstheorie einer Eliminierungs-Additions-Reaktion oder einer direkten nucleophilen Substitution unter Verdrängung der Aminogruppe konnte mit den Befunden der fehlenden Umsetzung mit Cystein und der Unwirksamkeit am Yoshida-Sarkom und am Sarkom 180 widerlegt werden. Für die aminomethylierten Stilböstrole und Hexöstrole ist vielmehr ein Östrogenantagonismus zu diskutieren, d. h. die Bindung körpereigenen Östrogens an Rezeptoren wird durch sie vermutlich kompetitiv gehemmt (näheres siehe Seite 19-23).

Die starken Wirkungsunterschiede zwischen den beiden Verbindungsklassen - 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene und 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane - am Mammacarcinom zeigen die Bedeutung der $-C=C-$ Doppelbindung für das Wirkgeschehen. In der Klasse der 3,3'-Bis-(amino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene zeichnen sich die stark lipoidlöslichen Verbindungen durch eine gesteigerte Wirkung aus. Anscheinend ist es möglich, durch Vergrößerung des Alkylamin-Restes die Rezeptoraffinität zu erhöhen.

In der Klasse der 3,4-Bis-(3'-amino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane hat der lipophile Charakter dagegen keinen Einfluß auf die tumorhemmende Wirkung.

Anlaß für die pharmakologische Prüfung der beiden Verbindungsklassen am Langendorff-Herzen war die bekannte coronardilatierende Wirkung von 4,4'-Diäthylamino-äthoxy-hexöstrol und der analogen Stilböstrol-Verbindung. Die amino-

methylierten Stilböstrole und Hexöstrole wirken am Langendorff-Herzen negativ inotrop und steigern nur kurzfristig den Coronardurchfluß. Damit sind die Anforderungen, die an einen Coronardilatator gestellt werden, nicht erfüllt.

Pharmakologische und chemische Versuche mit neuen N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethanen schließen sich an Untersuchungen unseres Arbeitskreises mit N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamidin (52) an.

Dabei konnten folgende Analogien zu den von Bindl (52) geprüften N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-benzamidin festgestellt werden:

1. Die Urethan-Lost-Aminale sind in ihrer tumorhemmenden Wirkung am Yoshida-Sarkom und am Sarkom 180 Nor-Lost und N-Methyl-Lost deutlich überlegen. Ihre Überlegenheit wird auch durch vergleichende Untersuchungen mit einem Harnstoff-Lost-Kondensat und verschiedenen bekannten N-Lost-Mannich-Basen (60, 61), die alle eine geringere tumorhemmende Aktivität besitzen, unterstrichen.

2. Die N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-urethane sind in ihrem reaktionsmechanistischen Verhalten den aromatischen N-Losten Chlorambucil und L-Sarkolysin analog. Darüberhinaus ist die Fähigkeit zur Amidomethylierung biologischer Substrate als weitere Wirkungsursache zu diskutieren.

Die besonders hohe tumorhemmende Wirkung von N-[Bis-(2-chloräthyl)-aminomethyl]-phenylurethan wird neben der Aminoäthylierung und Amidomethylierung biologischer Substrate mit der Bildung aktiver Spaltprodukte erklärt (Abb. 22, Seite 71).

Die Aminomethylierung als wirkungsmechanistisches Prinzip von Trihydroxymethyl-melamin konnte erstmals durch die in-vitro-Alkylierung von Morpholin unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde festgestellt, daß für die hervorragenden tumorhemmenden Eigenschaften von Trihydroxymethyl-melamin eine mittlere Zerfalls- und Alkylierungsgeschwindigkeit verantwortlich ist.

Der Versuch, mit s-Triazin-Abkömmlingen, Hexahydro-s-triazinen und N-Halb-acetalen und Aminen von Äthylurethan, Harnstoff, Biuret und Dicyandiamid Verbindungen von ähnlichen Stabilitäts- und Alkylierungseigenschaften aufzufinden, ist gescheitert. Diese Verbindungen besitzen alle eine gegenüber Trihydroxymethyl-melamin erhöhte bzw. verminderte Stabilität und Reaktivität und zeigen deshalb keine vergleichbare Wirkung am soliden Tumor.

G. Literaturverzeichnis

- 1) D.Adam, Diss. Univ. München, 1967
- 2) H.Hellmann, G.Opitz, α -Aminoalkylierung, Verlag Chemie, Weinheim, 1960, S. 140
- 3) T.N.Ghosh, J. Indian. Chem. Soc., 28, 268 (1951)
- 4) A.Cohen et al., Brit. J. Pharmacol., 12, 194 (1957)
- 5) W.M.Dufflin, E. PP. 788 082, C. 1958, S. 9573
- 6) " , " 788 122, " , S. "
- 7) " , " 788 196, " , S. "
- 8) A.Cohen, B.Heath-Brown, E. P. 762 720; C. 1958, 13857
- 9) " , " 763 406; C. " , 6917
- 10) F.Hofmann-La Roche, Brit. 787 088; C.A. 52, 10214 (1958)
- 11) H.A.Bruson, U.S., 2763 657; C.A. 32, 4252 (1938)
- 12) M.Walter (F.Hofmann-La Roche) DBP 945449; C. 1957, 3941
- 13) H.A.Bruson (Röhm u. Haas Co), A. PP. 2040039; C. 1936, II 1385
- 14) " " , " 2040040; C. " "
- 15) F.Hofmann-La Roche, Brit., 769963; C.A. 51, 17994 (1957)
- 16) L.J.Exner, E.E.Craig (Röhm u. Haas Co) U.S. 2750416; C.A. 51, 2034 (1957)
- 17) M.Walter (F.Hofmann-La Roche), U.S. 2795613; C.A. 52, 437 (1958)
- 18) J.R.Meadow, J. Am. Chem. Soc., 76, 3479 (1954)
- 19) J.H.Burckhalter, J. Am. Chem. Soc., 72, 5309 (1950)
- 20) " , " , 72, 2303 (1950)
- 21) " , J. Am. Pharm. Assoc., 38, 658 (1949)
- 22) R.F.Brown, S.J.Miller, J. Org. Chem., 11, 388 (1946)
- 23) C.C.Price, W.G.Jackson, J. Am. Chem. Soc., 68, 1282 (1946)
- 24) J.H.Burckhalter, J. Am. Chem. Soc., 68, 1204 (1946)
- 25) " et al., " , 73, 4837 (1951)
- 26) " " , " , 74, 5209 (1952)
- 27) " " , " , 70, 1363 (1948)

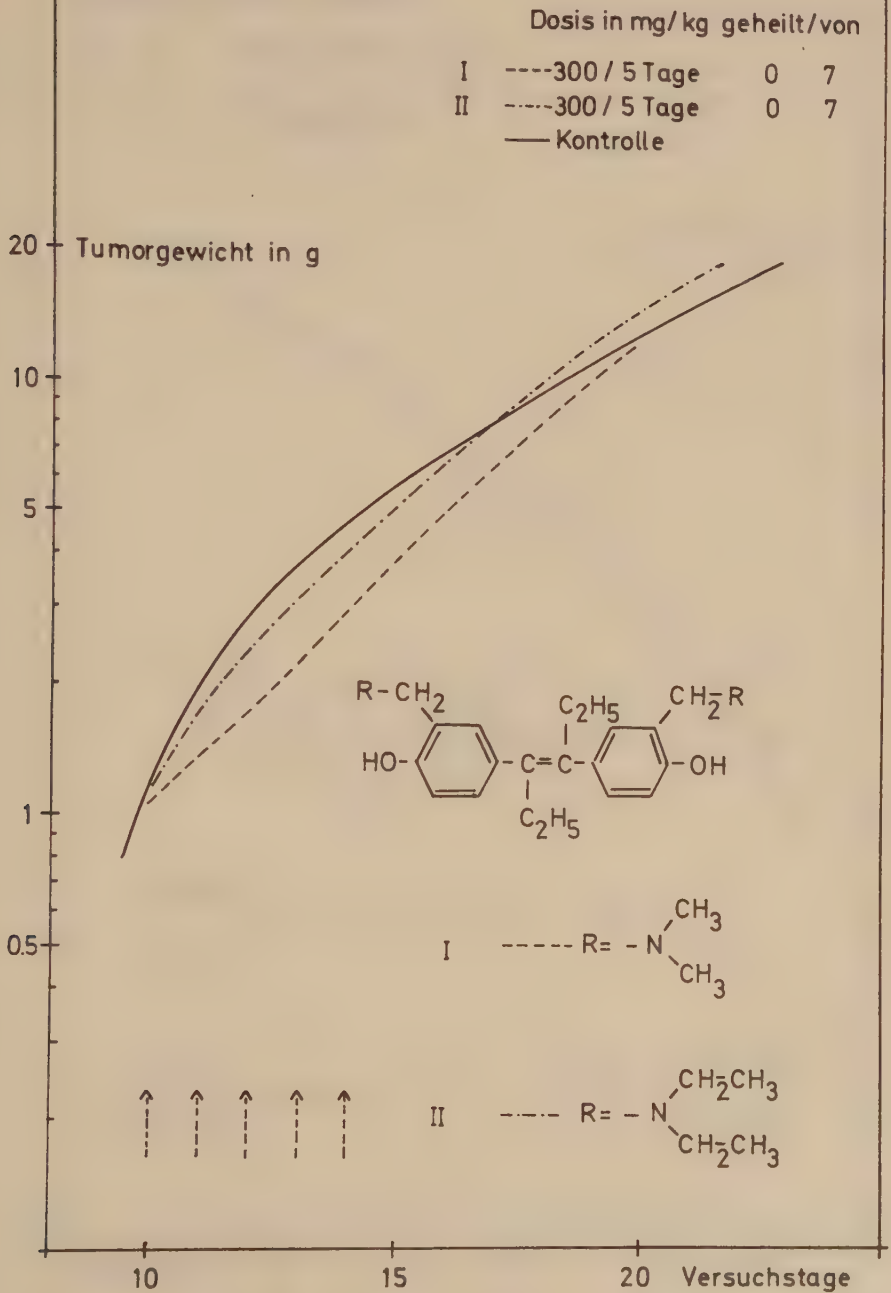
- 53) F.Hildebrandt, Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Bd. V, 8, S. 885
- 54) H.Williams-Ashman, J.Shimyzyki, Univ. Chicago Press, 1867
- 55) R.Charlier, Coronary Vasodilators, Pergamon Press, New York, 1961,
S. 163
- 56) W.A.Sexton, Chem. Konstitution und biol. Wirkung, Verlag Chemie,
Weinheim
- 57) G.Weitzel et al., Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie, 334, 1
(1963)
- 58) H.Schönenberger et al., Arzneimittel Forsch., 14, 1168 /1964
- 59) J.A.Hendry, F.L.Rose, Brit. J. Pharmacol., 6, 201 (1956)
- 60) W.Werner, Arch. Pharm., 229, 513 (1966)
- 61) M.Mühlstädt et al., J. pr. Chem., 20, 187 (1963)
- 62) E.Boyland, R.Nevy, Biochem. J., 89, 113 P
- 63) E.Bresnick, Fed. Proc., 19, 313 (1960)
- 64) R.C.Elderfeld, J.R.Wood, J. org. Chem., 27, 2463 (1962)
- 65) G.R.Pettit, J.A.Settepani, J. org. Chem., 27, 1714 (1962)
- 66) G.R.Pettit, A.K.Das Gupta, Chem. and Ind., 1962, 1016
- 67) R.E.Williams, B.Witten, Cancer Res., 27, 33 (1967)
- 68) W.A.Sexton, Chem. Konstitution u. biol. Wirkung, Verlag Chemie, 1958,
S. 351 f
- 69) G.R.Pettit, J. org. Chem., 27, 2962 (1962)
Angew. Chemie, 77, 388 (1963)
- 70) F.L.Rose, H.L.Walpole, Nature (Lond.), 1950, 933
- 71) O.Eichler, W.Plewa, Arzn. Forsch., 2, 259 (1952)
- 72) O.Eichler, J.Staib 3, 555 (1953)
4, 268 (1964)
- 73) H.Schmidt-Elmendorff, P.P.Koelzer, Ztschr. f. d. ges. Med., 129, 314
(1957)
- 74) P.Emmelot, The Basis of Cancer Chemoth., Molec. Pharmacol., Vol II
- 75) B.G.Ellion et al., Cancer Res., 18, 802 (1958)
- 76) M.Brugger, Diss. Univ. Freiburg, 1921
- 77) M.Paquin, Angew. Chemie, A 60, 267 (1948)

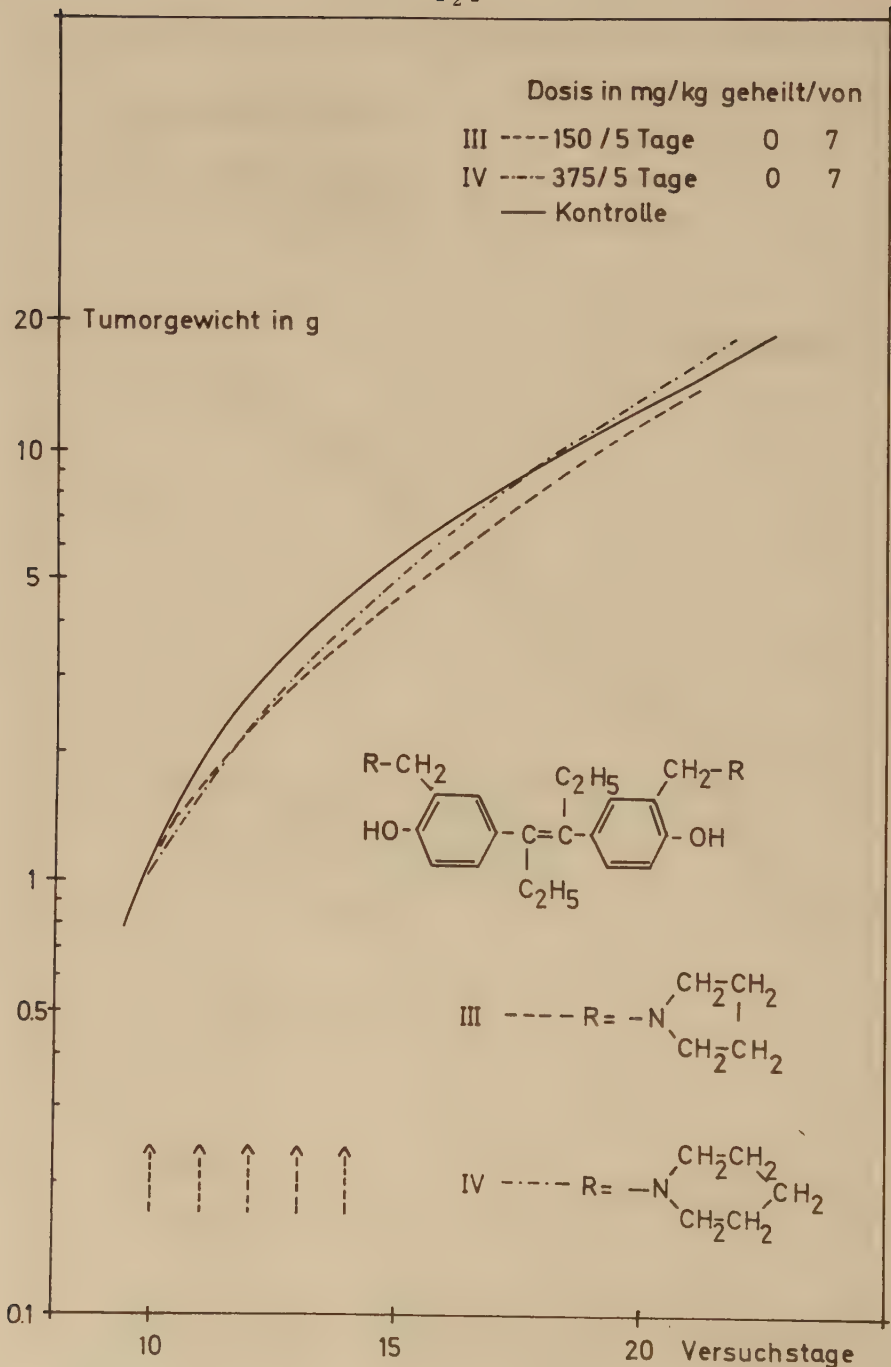
- 78) F.Walker, Formaldehyde, Shapman and Hall Ltd. London, 3. Ausg.,
S. 379
- 79) W.I.Weaver et al. , J. Am. Chem. Soc. , 66, 222 (1964)
- 80) O.Acklin, Therapeut. Umschau, 2, 73 (1945)
- 81) J.Wall et al. , J. Med. Chem. , 12, 810 (1969)
- 82) D'ANS LAX, Taschenb. f. Chemiker u. Physiker 1949, S. 1595
- 83) H.Druckrey, Alkylierend wirkende Verbindungen, Wiss. Forschungsstelle
im Verband der Zigarettenindustrie, 1969, 42
- 84) G.Weitzel et al. , Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem. , 336, 107
(1964)
- 85) H.Schönenberger et al. , Arzneimittel Forsch. , 16, 734 / 1966
- 86) P.Lippert, Diss. Univ. München, 1970
- 87) H.Böhme et al. , Arch. Pharm. , 300, 148
- 88) 647
- 89) 922
- 90) N.Kreutzkamp, H.Peschel, Dtsch. Apoth. Ztg. , 108, 1281 (1967)
- 91) C.D.Stevens, R.C.Mosteller, Canc. Res. , 29, 1132 (1963)
- 92) H.Böhme et al. , Arch. Pharm. , 300, 148
- 93) E.Harbers, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964, S. 197
- 94) O.Eichler et al. , Arzn.' Forsch. , 6, 119 (1966)
- 95) J.Holzheu-Eckart, Diss. Univ. München, 1961
- 96) H.Schönenberger et al. , Arzn. Forsch. , 12, 1162 (1962)
13, 930 (1967)
- 97) T.Bastug, Diss. Univ. München, 1969, Lit. (64-73)
- 98) W.C.J.Ross, Biol. Alkylating Agents, Butterworths, London, 1962

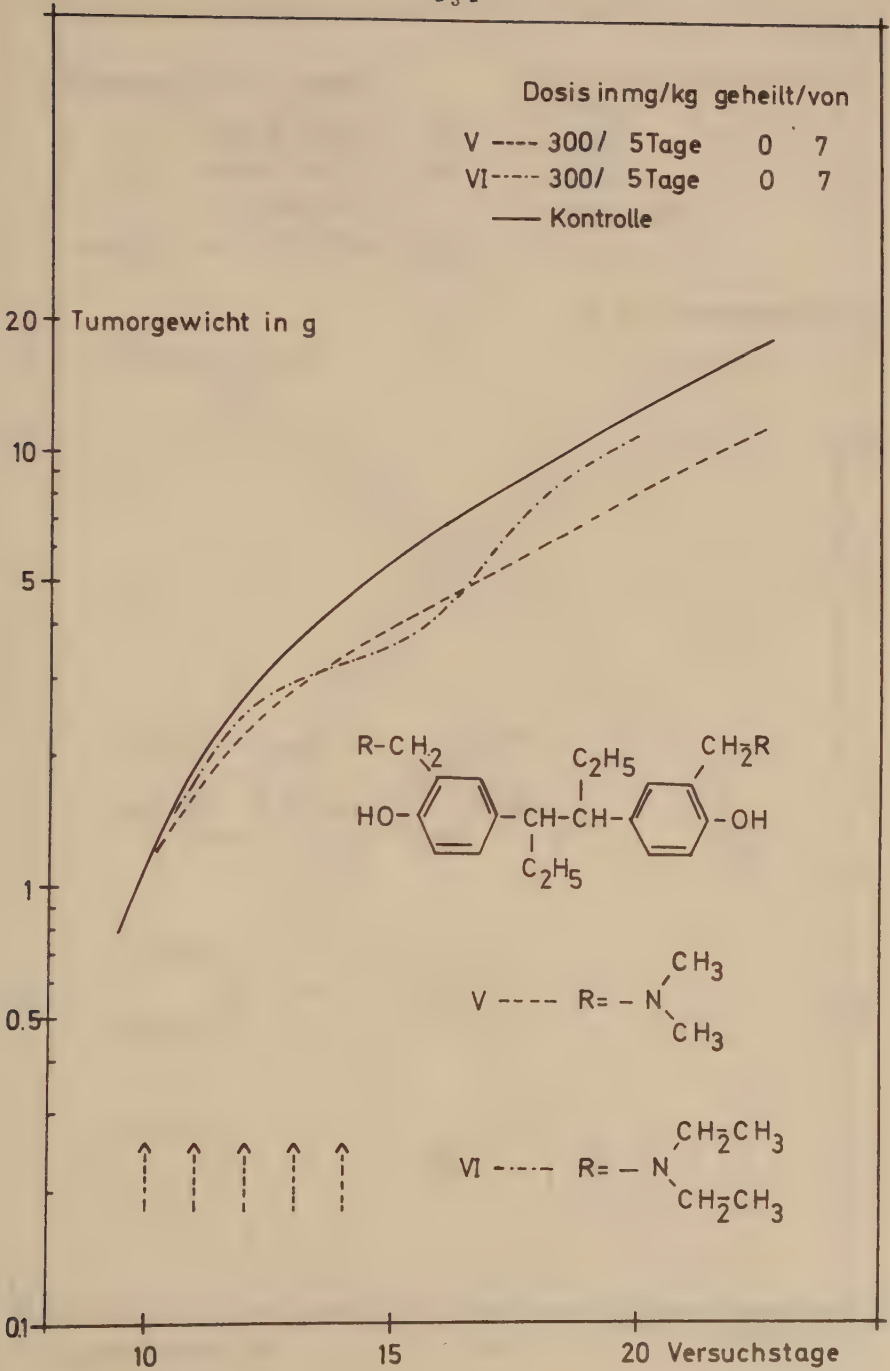
Anhang

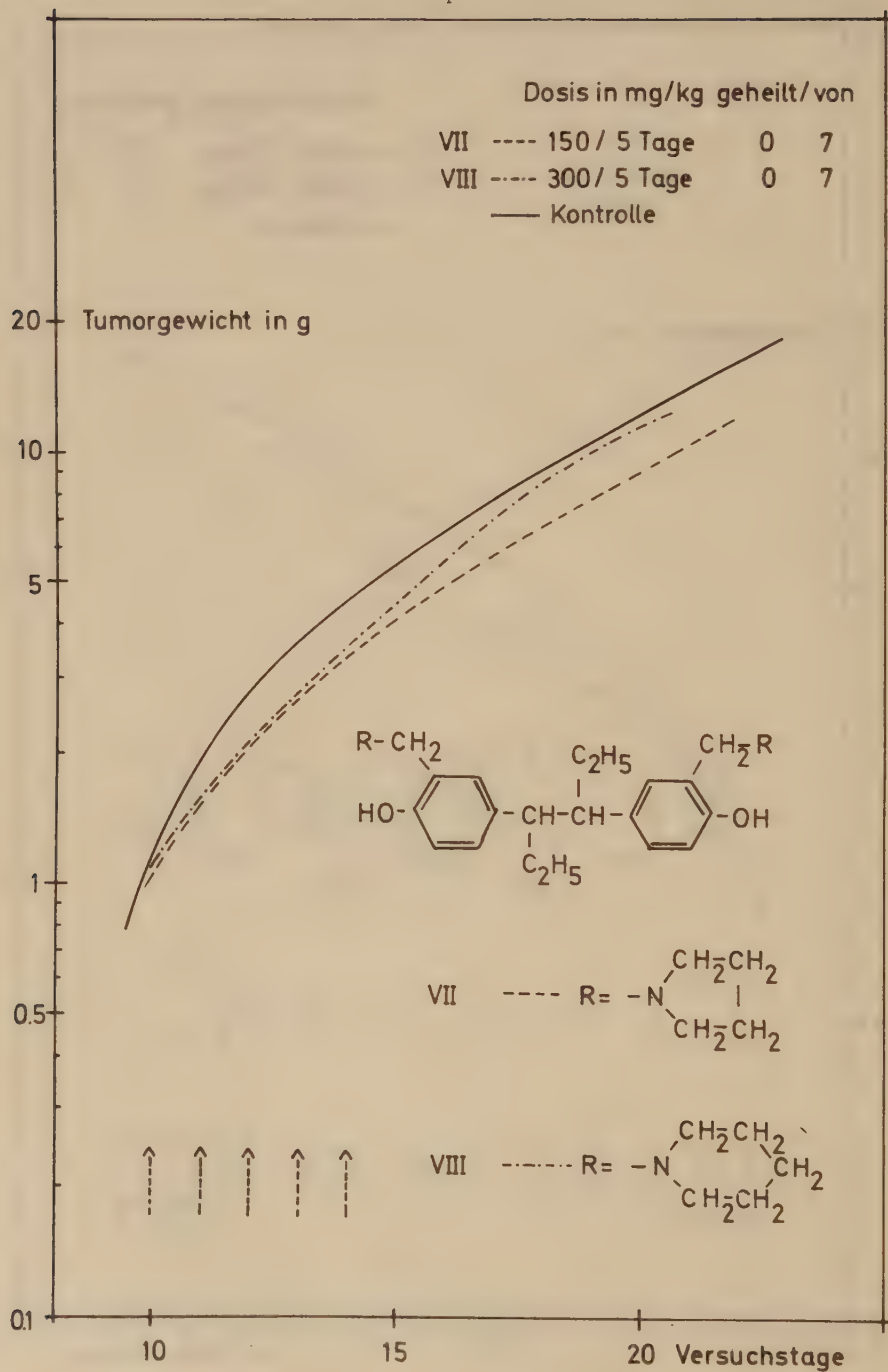
Tumorwachstumskurven der geprüften Verbindungen am

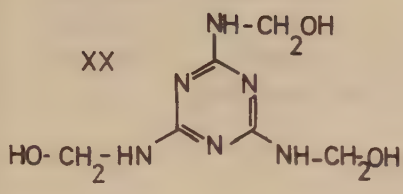
	Seite
Yoshida-Sarkom der Ratte	- 1 -
Sarkom 180 der Maus	- 17 -
Mammacarcinom der Sprague-Dawley-Ratte	- 24 -



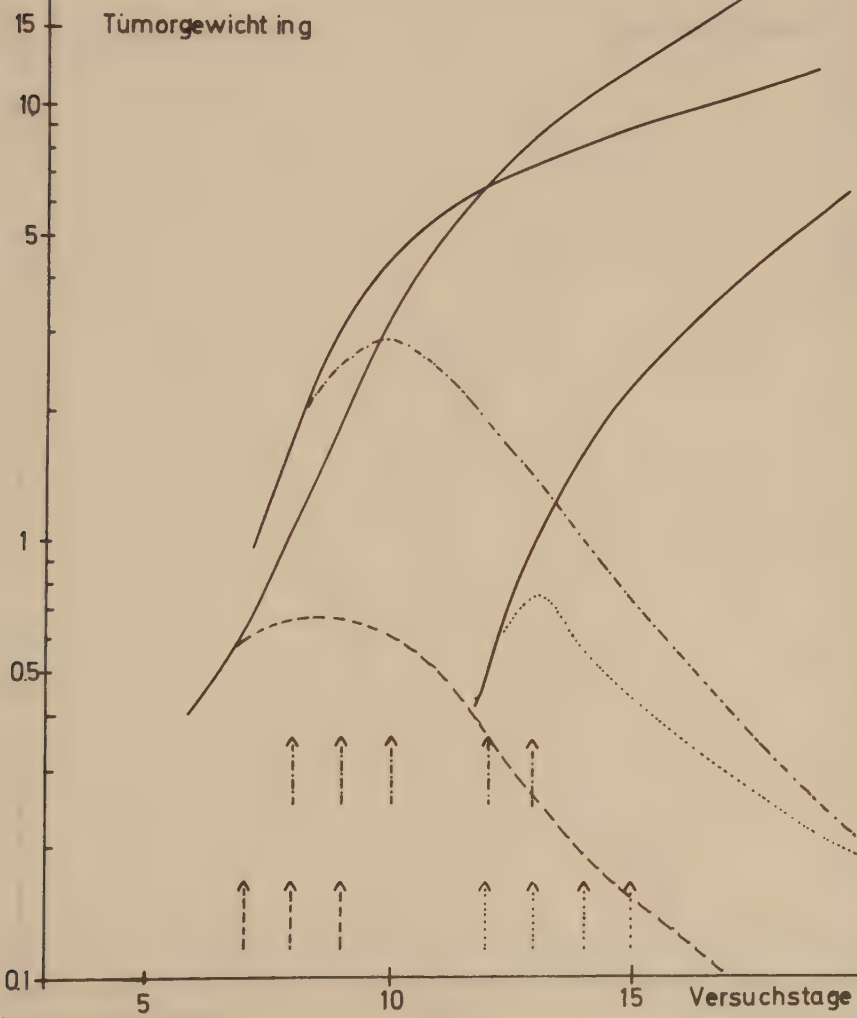




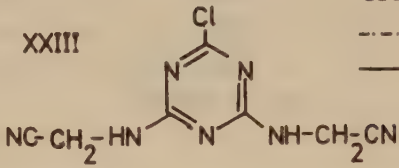




Dosis mg/kg	geheilt	von
--- 2100	5	5
- - - 1500	6	6
..... 2000	3	4
— Kontrollen		



XXIII

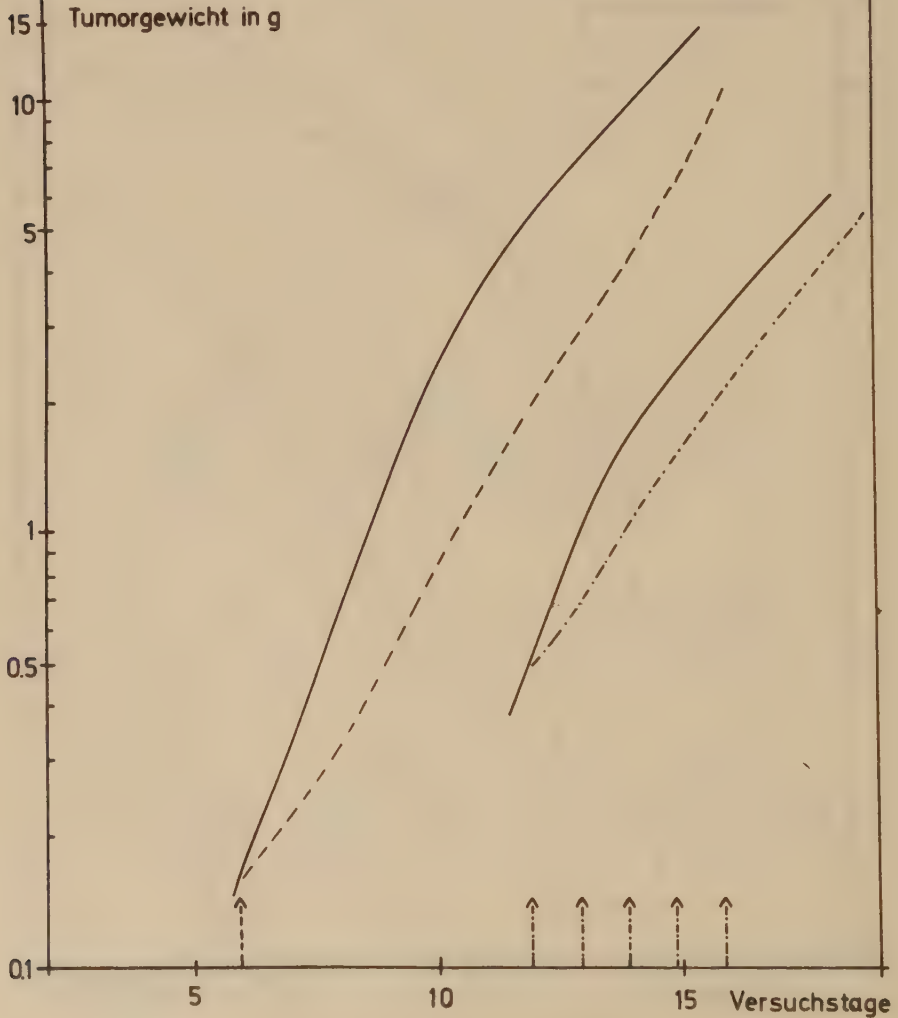


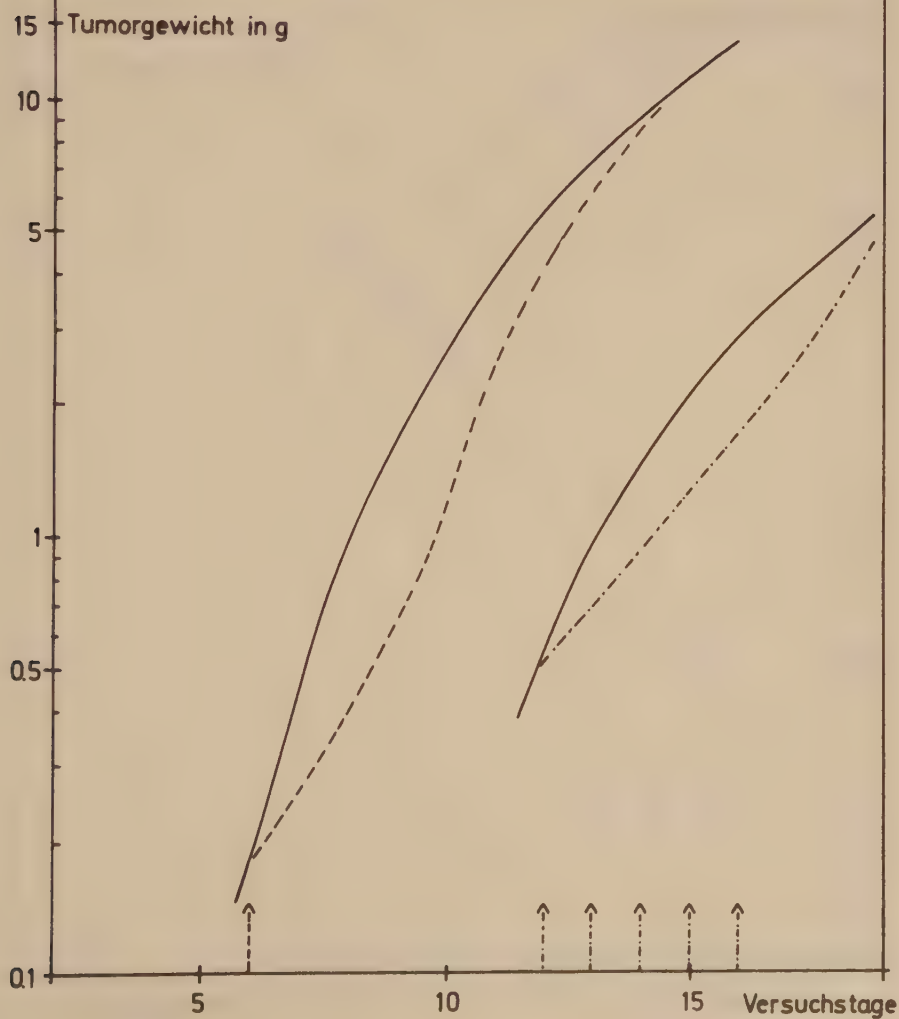
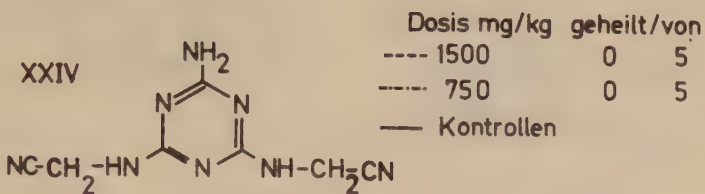
Dosis mg/kg geheilt/von

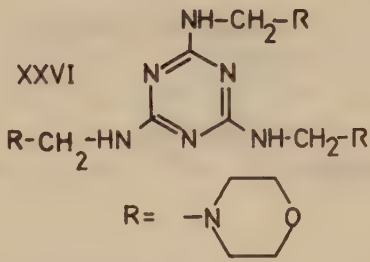
----- 2000 0 5

- . - . 1000 0 4

— Kontrollen







Dosis mg/kg geheilt/von

----- 600 0 5

———— Kontrolle

15 Tumorgewicht in g

10

5

1

0.5

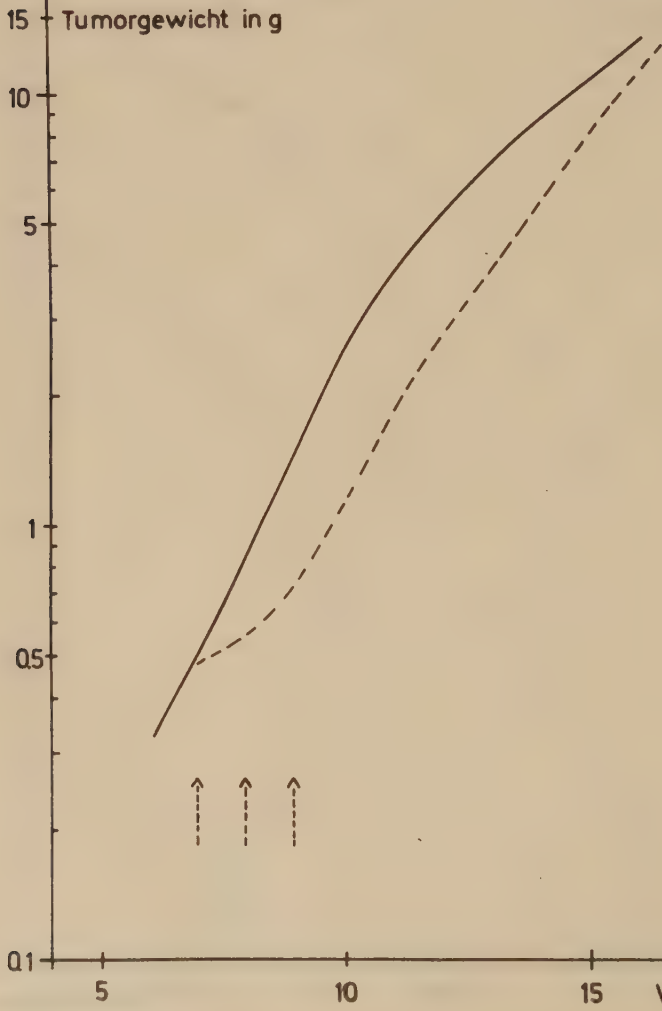
0.1

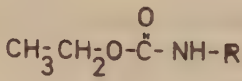
5

10

15

Versuchstage





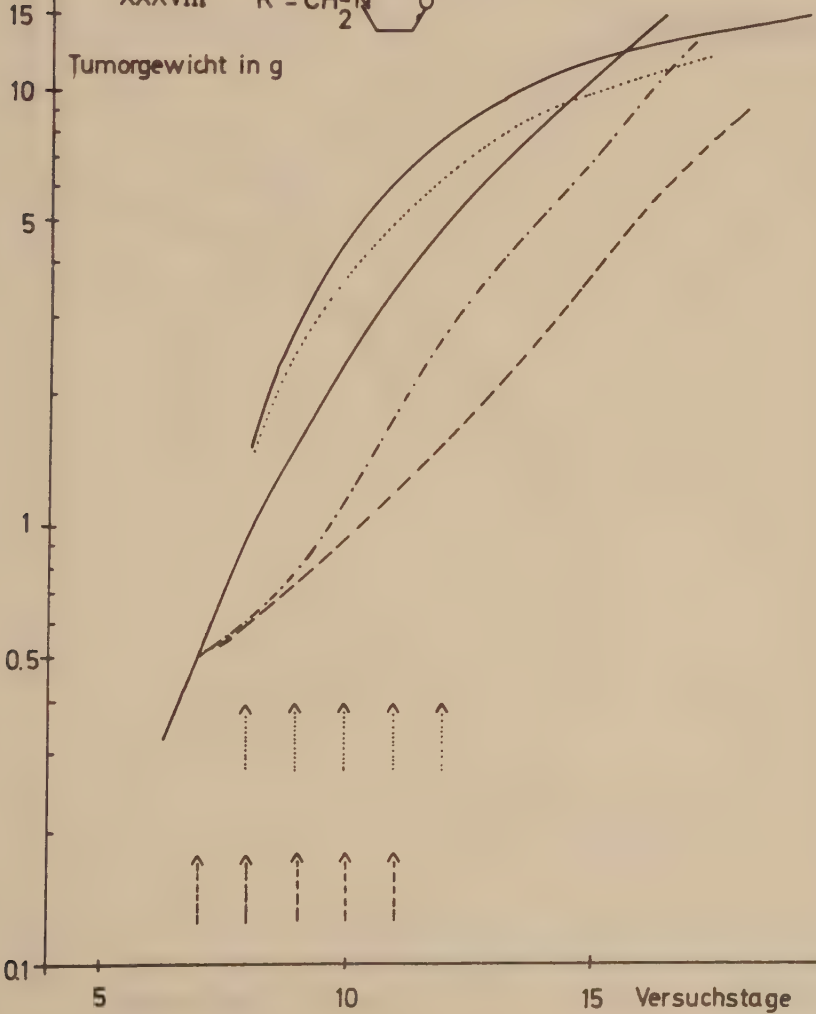
U : R = H

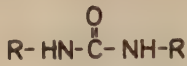
XXXVII R = $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

XXXVIII R = CH_2N 

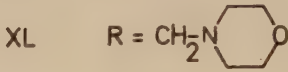
Dosis in mg/kg geheilt/von

----	U 1000	0	5
----	XXXVII 350	0	5
.....	XXXVIII 500	0	5
—	Kontrollen		





XXXIX R = CH₂OH



Dosis in mg/kg geheilt/von

XXXIX --- 1500 0 4

XL --- 1700 0 4

— Kontrollen

15 Tumorgewicht in g

10

5

1

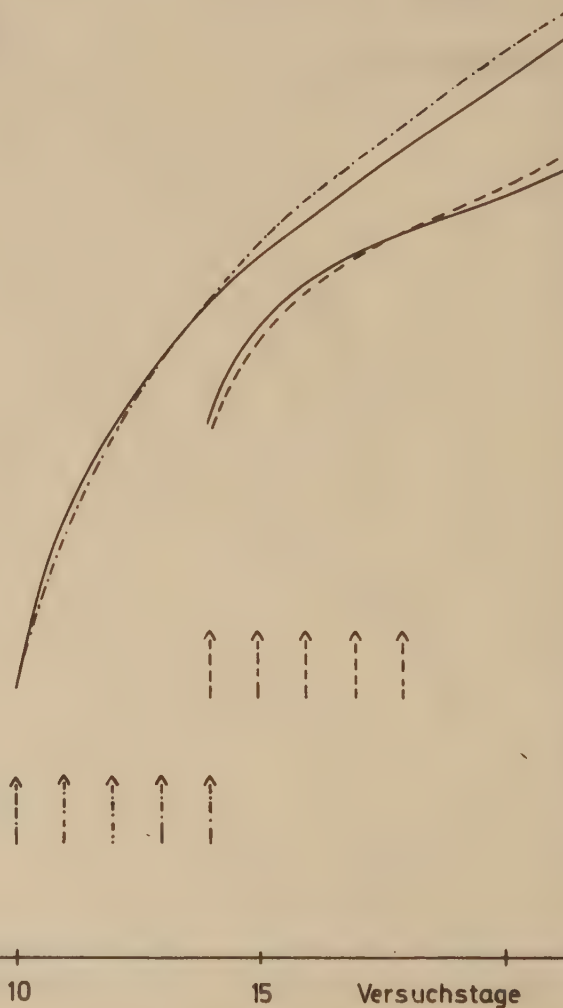
0.5

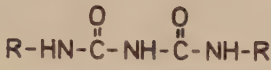
0.1

10

15

Versuchstage





XLI R = CH₂-OH

XLII R = CH₂-N₂

Dosis in mg/kg geheilt/von

XLI ---- 5000 0 5

XLII ---- 7500 0 5

— Kontrolle

15 Tumorgewicht in g

10

5

1

0.5

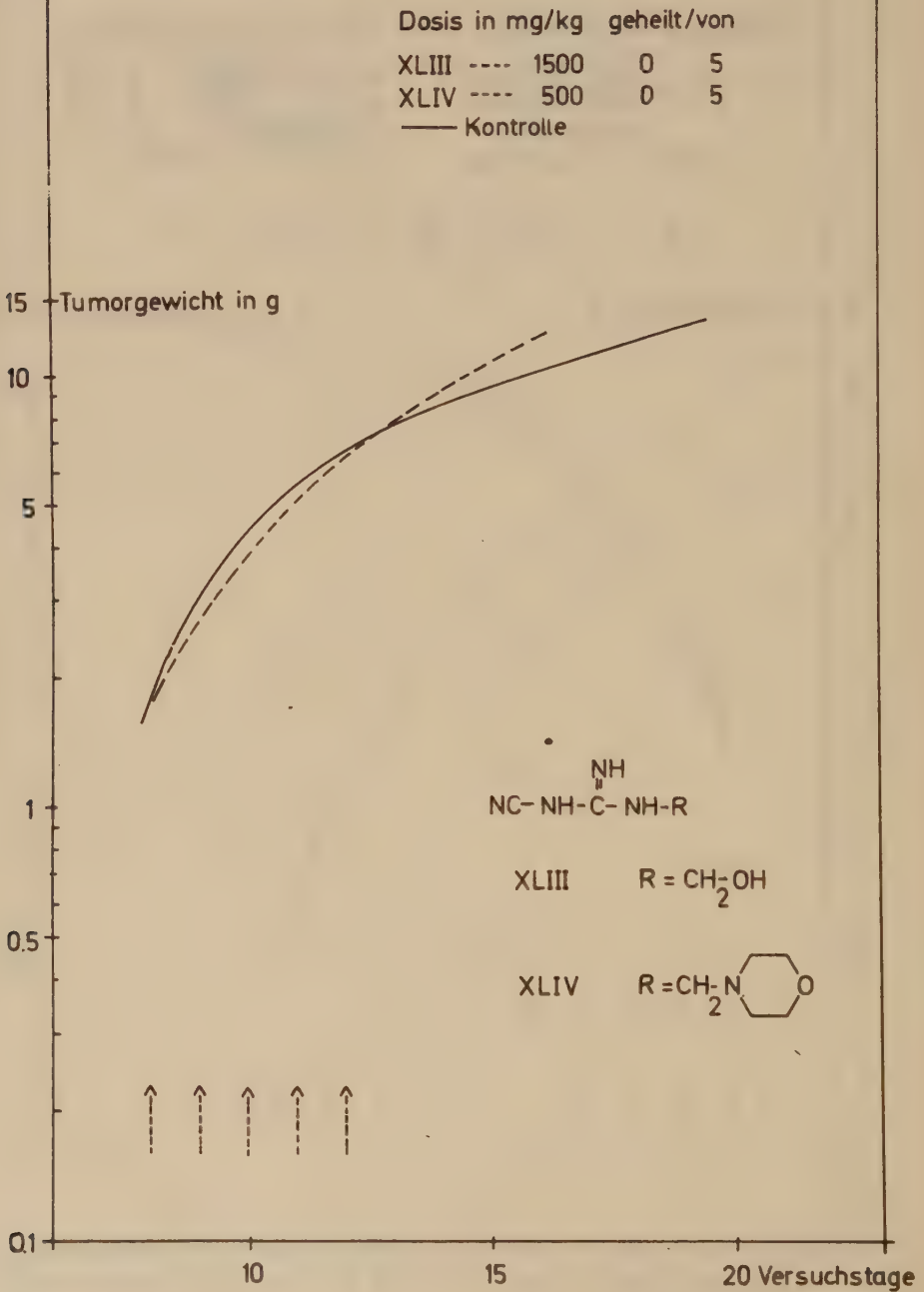
0.1



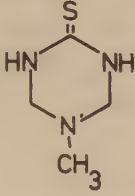
10

15

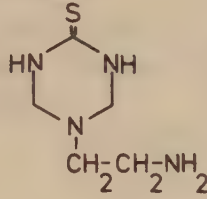
20 Versuchstage



XXVII



XXVIII



Dosis mg/kg geheilt/von

--- 10000	0	4
-.-.- 300	0	4
— Kontrollen		

20 Tumorgewicht in g

15

10

5

1

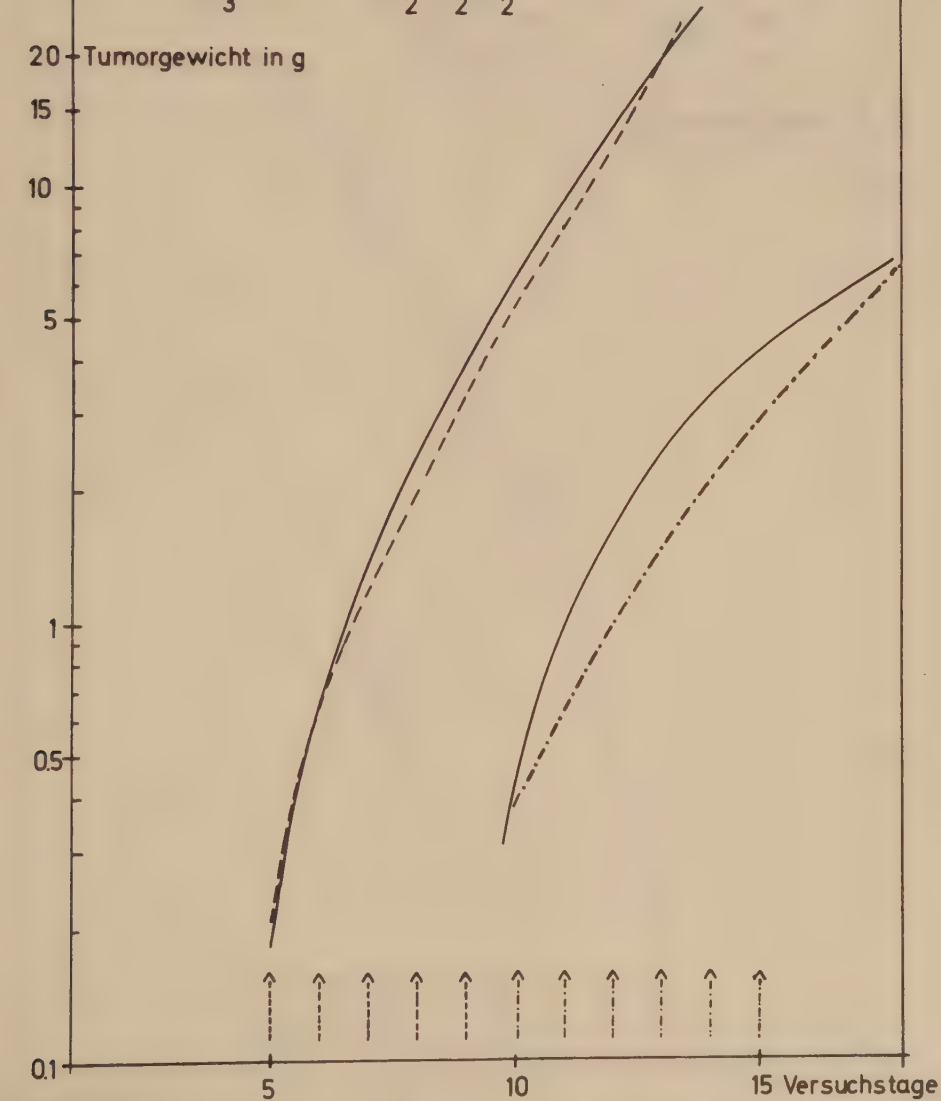
0.5

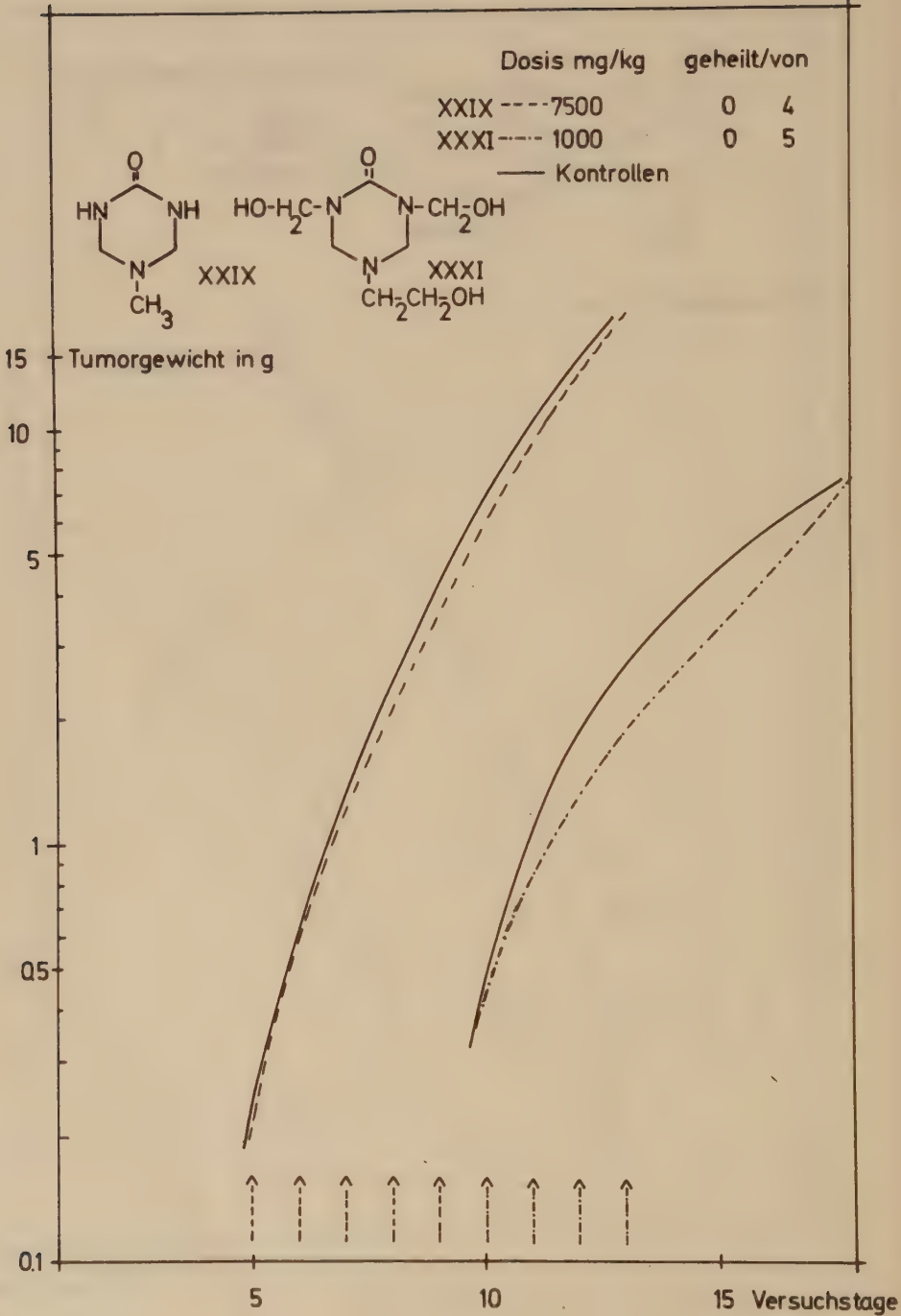
0.1

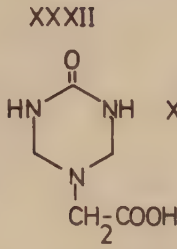
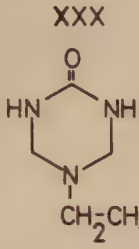
5

10

15 Versuchstage







Dosis mg/kg geheilt/von

XXX	-----	7500	0	4
XXXII	- · - · -	3200	0	5
	—	Kontrollen		

Tumorgewicht in g

20

15

10

5

1

0.5

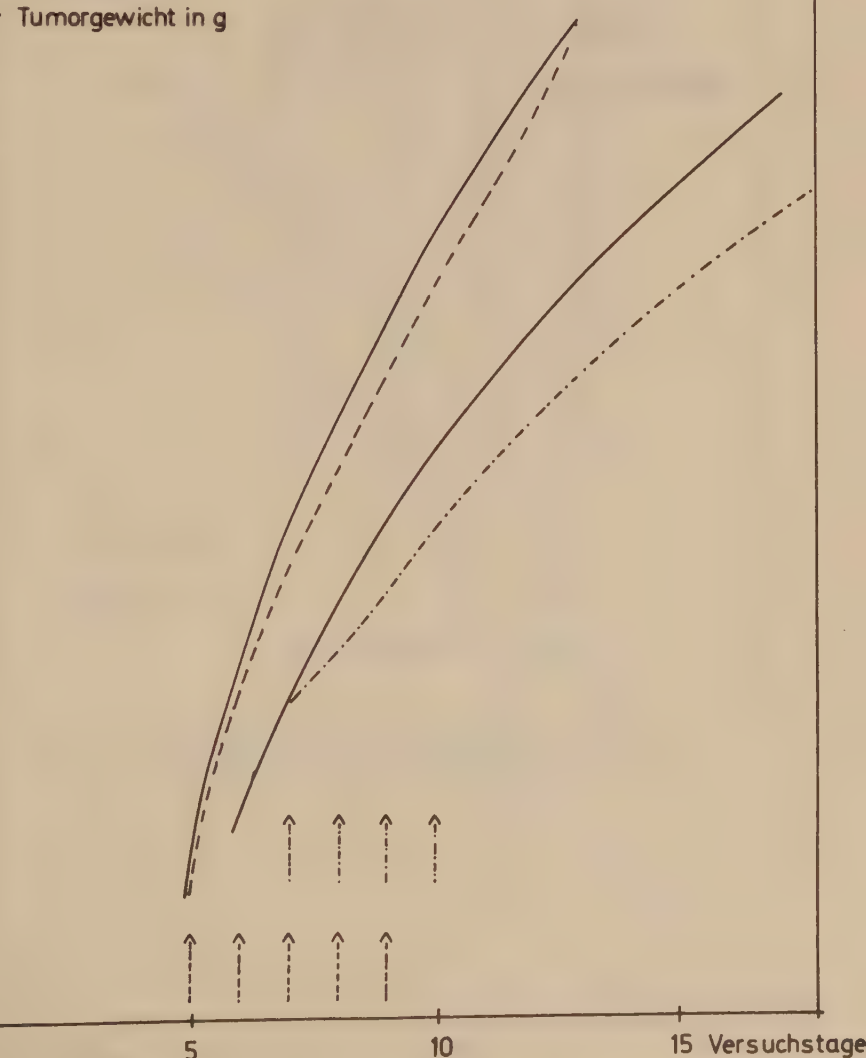
0.1

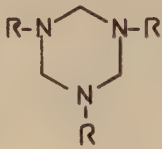
5

10

15

Versuchstage





Dosis in mg/kg geheilt/von

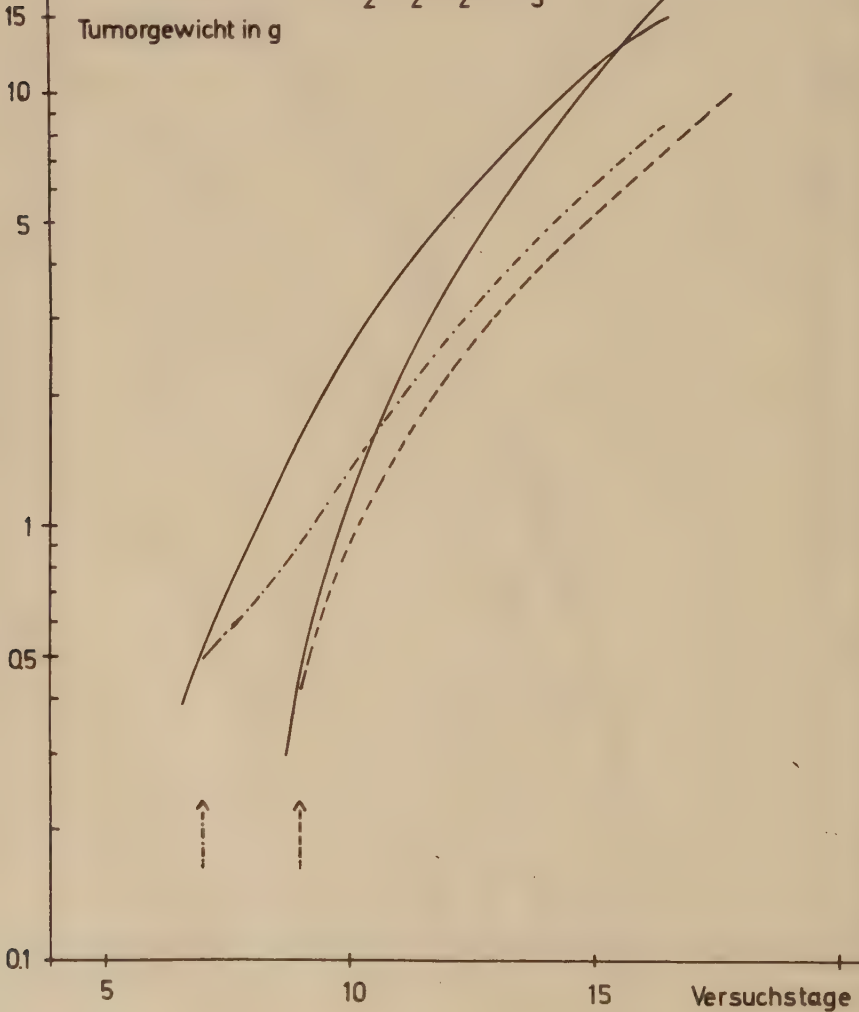
--- XXXIII 50	0	4
- - - XXXIV 60	0	5
--- XXXV 50	0	4
— Kontrollen		

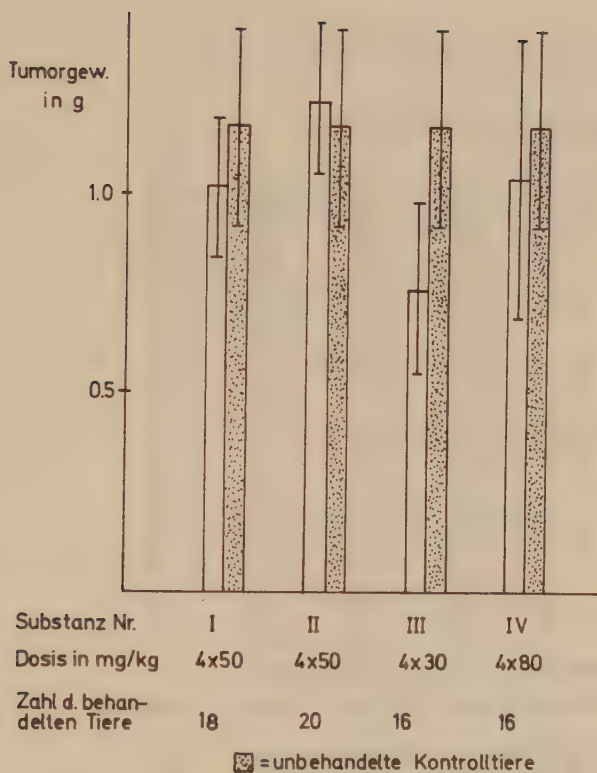
XXXIII R = CH₂CH₂OH

XXXIV R = CH₂CH(OH)CH₃

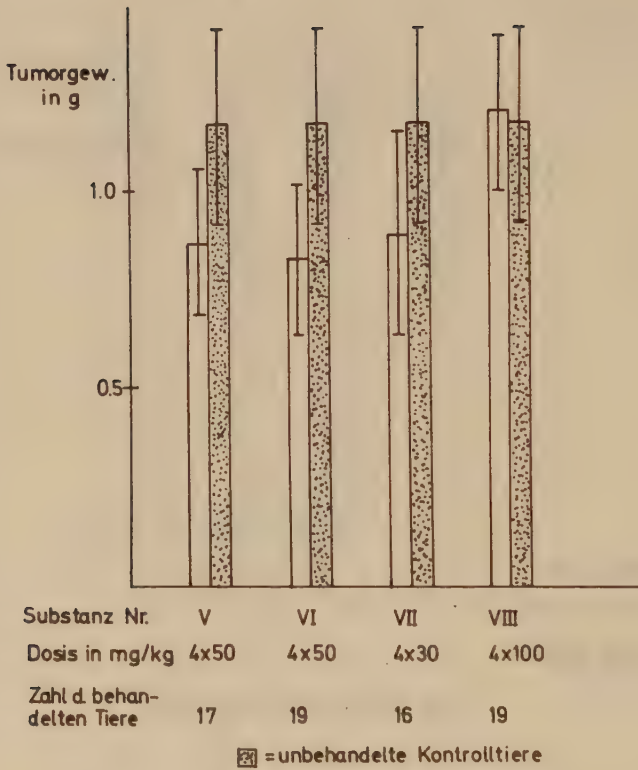
XXXV R = CH₂CH₂CH₂OCH₃

Tumorgewicht in g

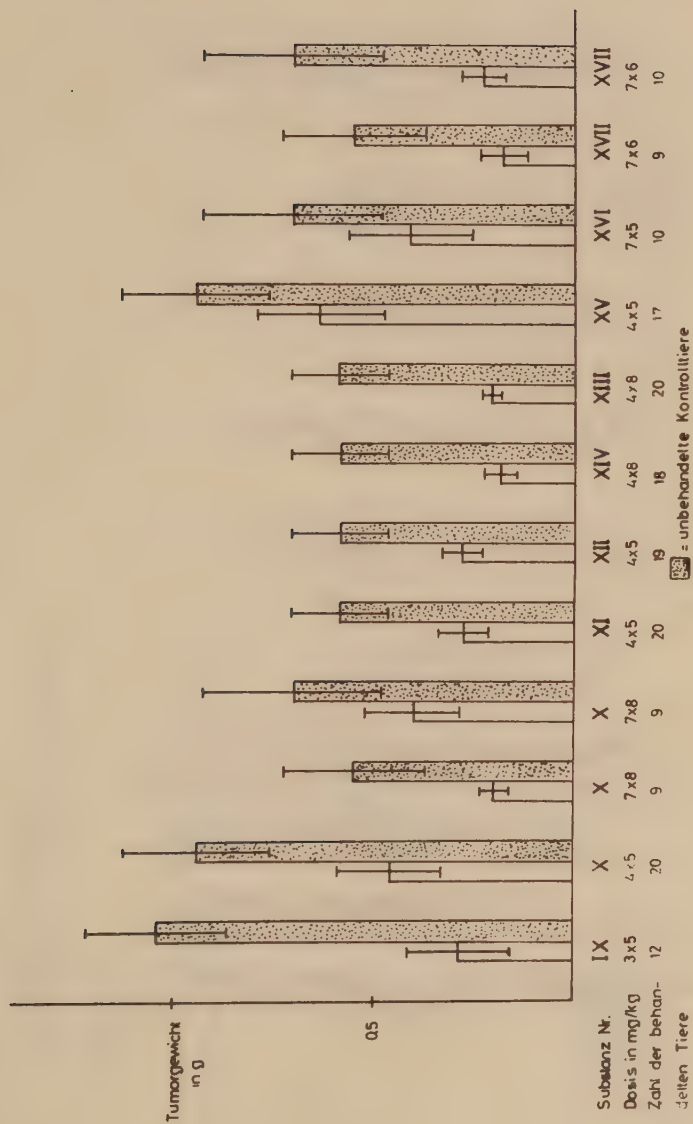




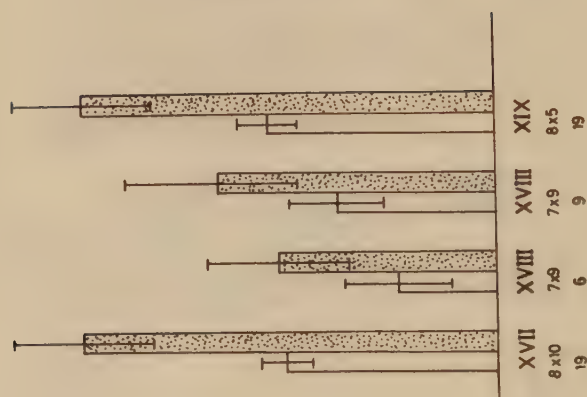
Wirkung der 3,3'-Bis-(dialkylamino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene am Sarkom 180 der Maus



Wirkung der 3,4-Bis-(3'-dialkylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane am Sarkom 180 der Maus

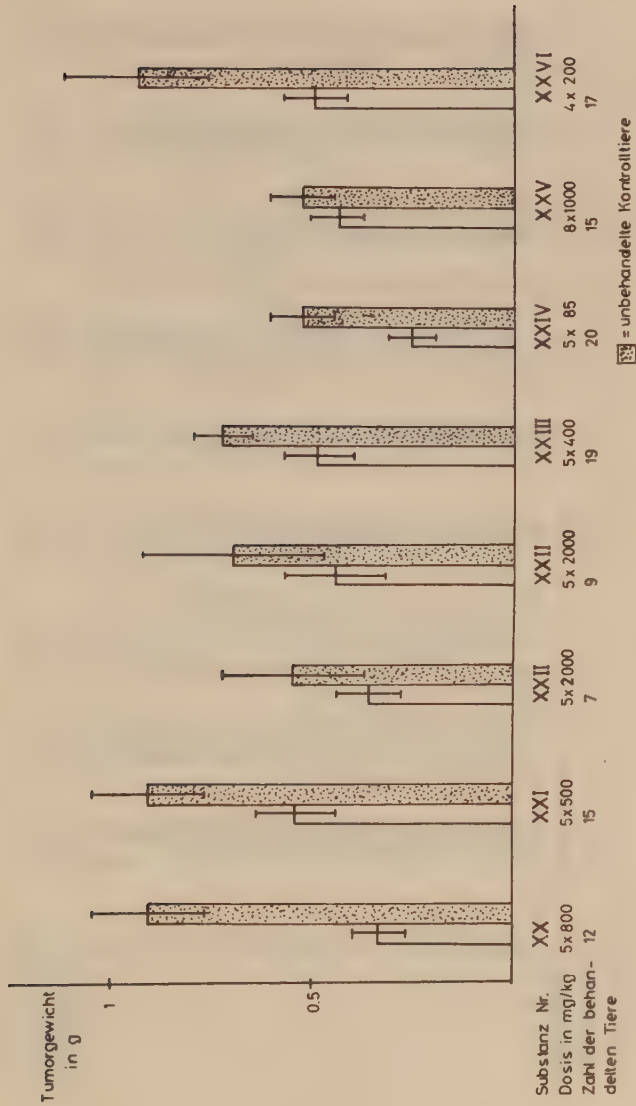


Wirkung der N-Lost-N-Mannich-Basen am Sarkom 180 der Maus

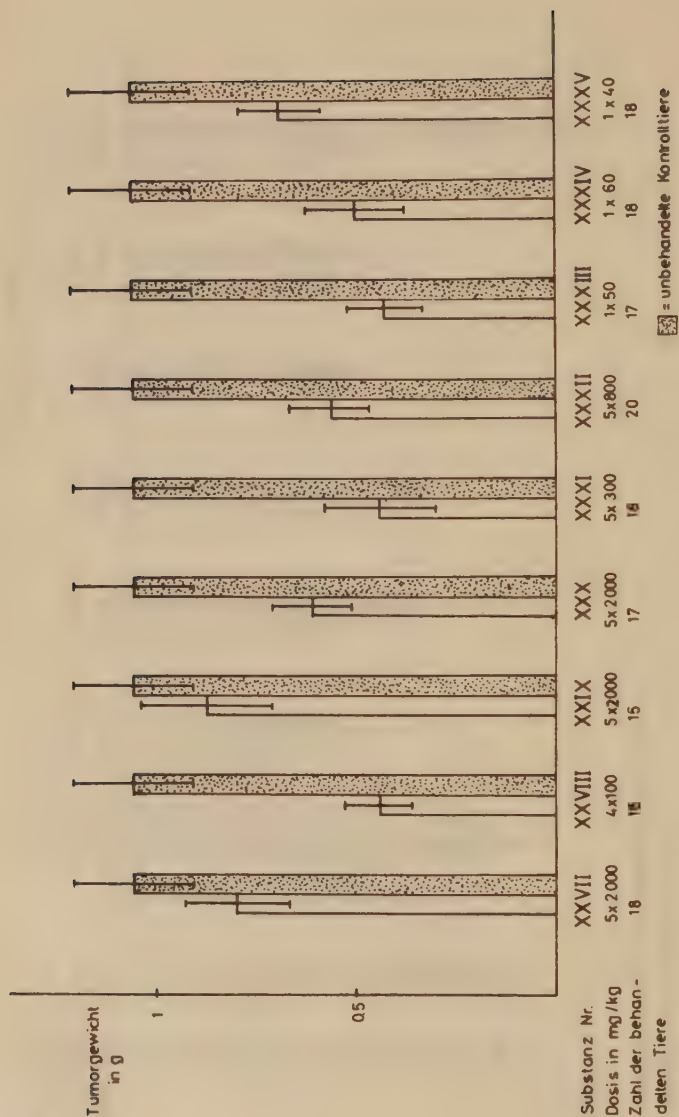


Wirkung der N-Lost-N-Mannich-Basen
am Sarkom 180 der Maus

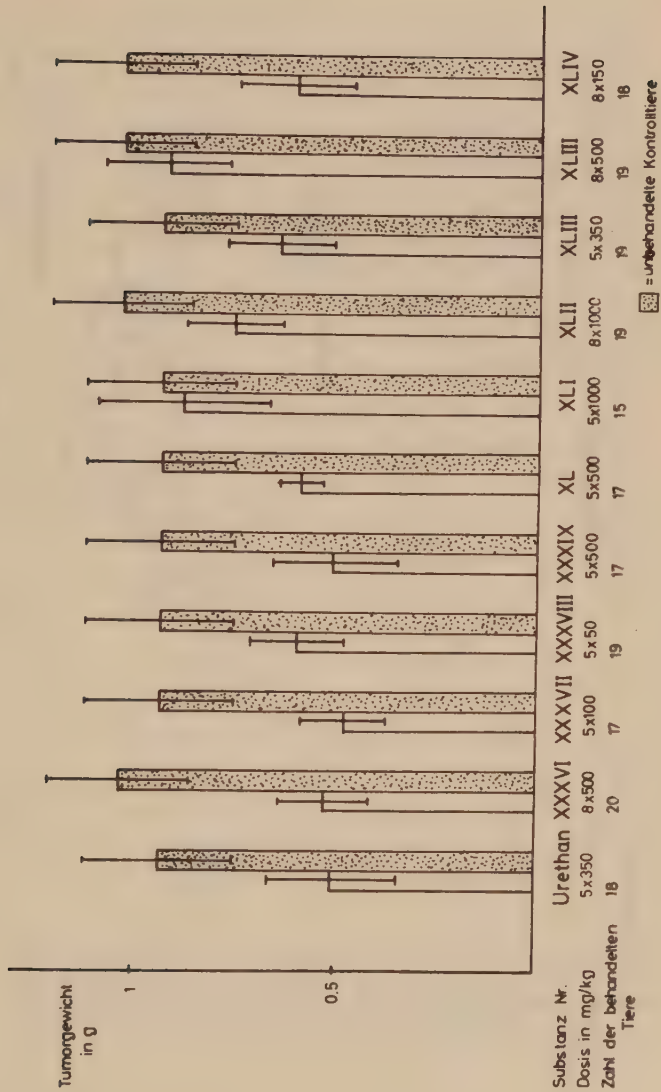
(Fortsetzung)



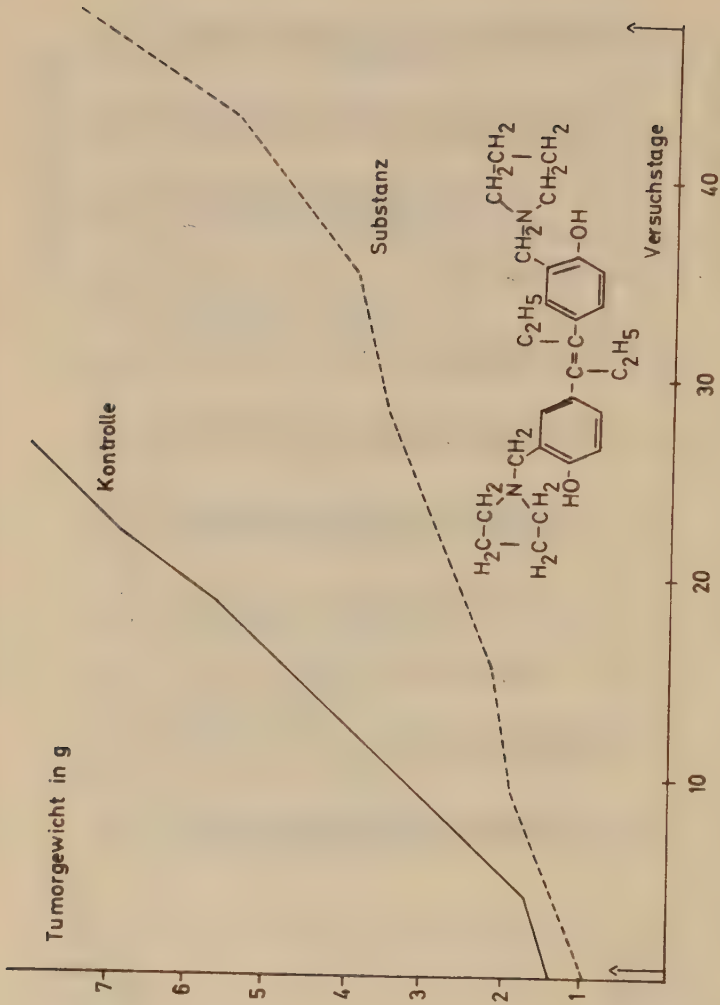
Wirkung der s-Triazin-Derivate am Sarkom 180 der Maus



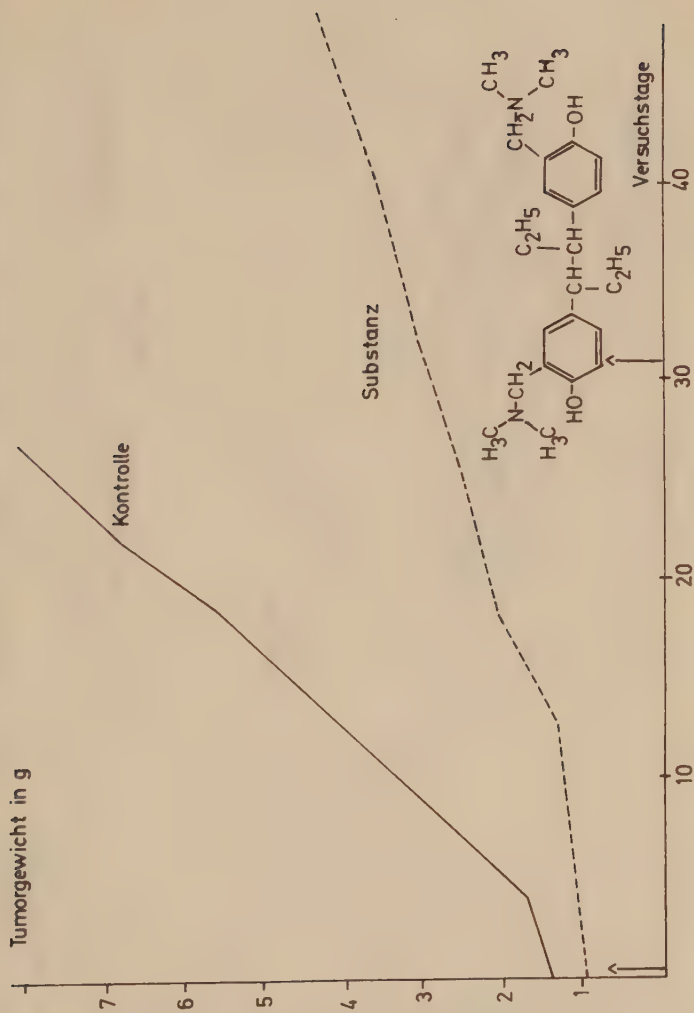
Wirkung der Hexahydro-s-triazine am Sarkom 180 der Maus



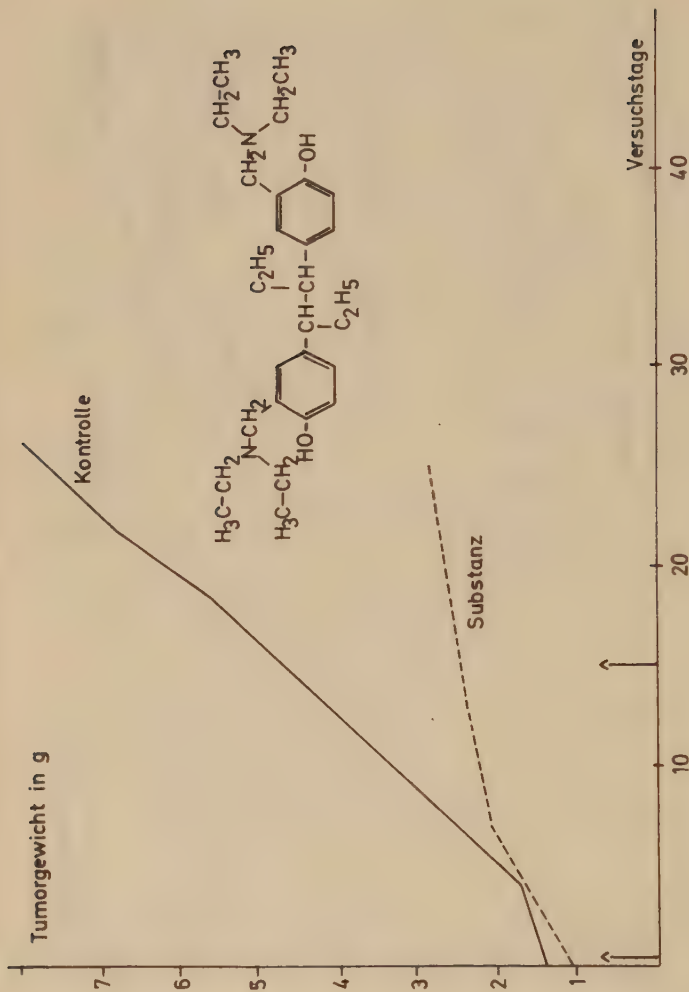
Wirkung der N-Halbacetale und Aminoale am Sarkom 180 der Maus



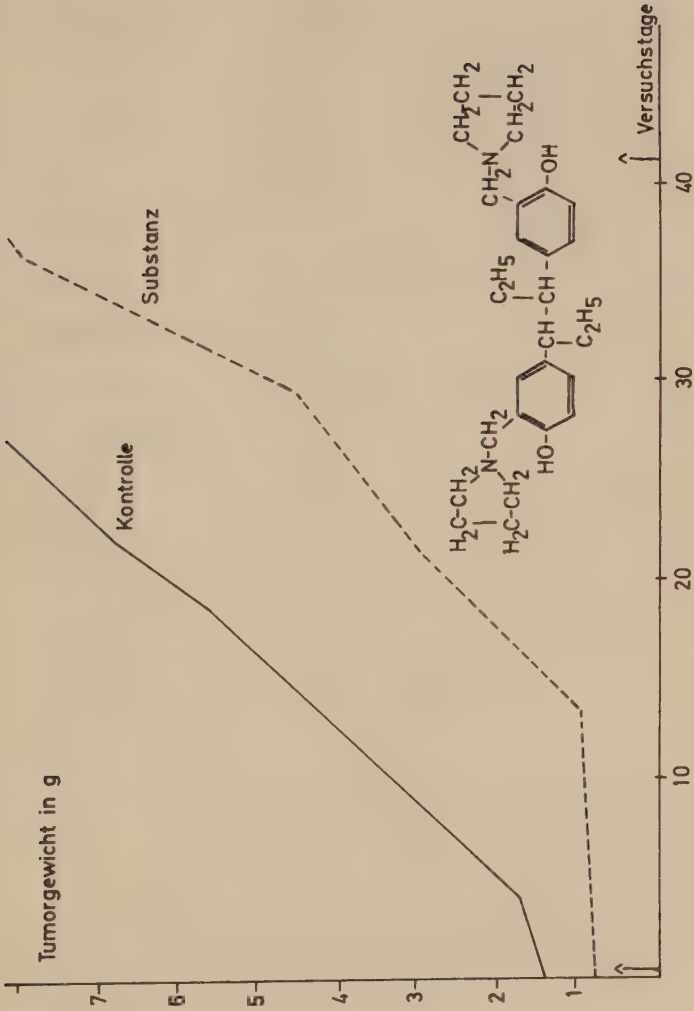
Wirkung von 3,3'-Bis-(pyrrolidino-methyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben (III) am Benzidin-induzierten Mamma-carcinom der Ratte
Dosis: 1.040 mg/kg auf 52 Tage



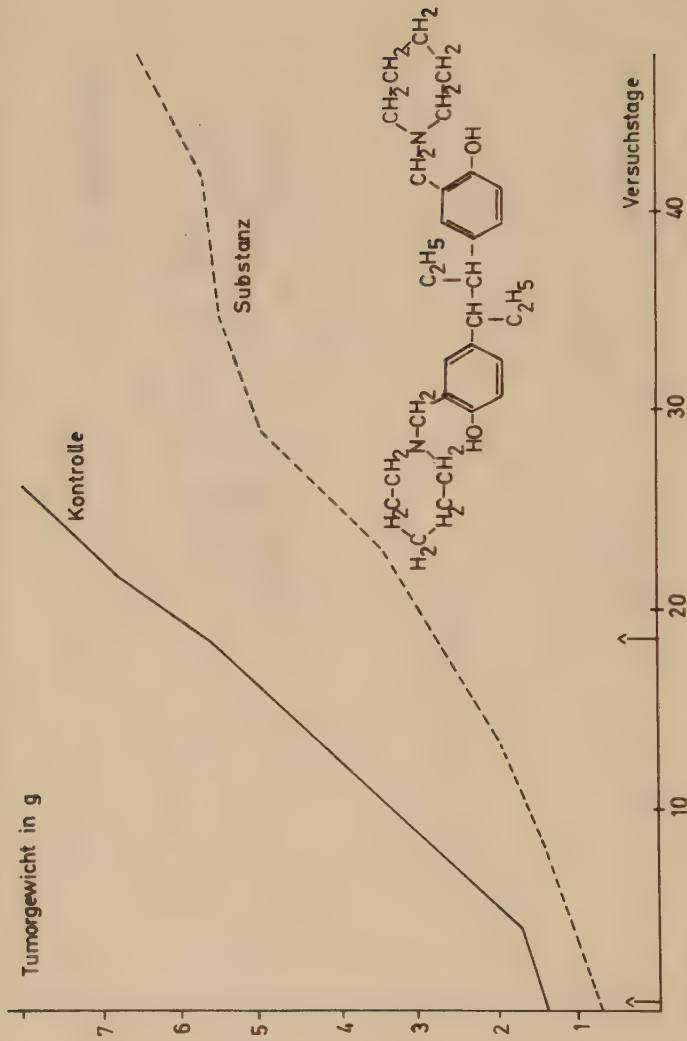
Wirkung von 3,4-Bis-(3'-dimethylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (V) am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte
Dosis: 2.560 mg/kg auf 32 Tage



Wirkung von 3, 4-Bis-(3'-diäthylamino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (VI) am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte
Dosis: 4, 500 mg/kg auf 15 Tage



Wirkung von 3, 4-Bis-(3'-pyrrolidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (VII) am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte
Dosis: 1.680 mg/kg auf 42 Tage



Wirkung von 3, 4-Bis-(3'-piperidino-methyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexan (VIII) am Benzidin-induzierten Mammacarcinom der Ratte

Dosis: 9.000 mg/kg auf 18 Tage

Lebenslauf

Friedrich Schmidt geboren am 23. 6. 1939 in Berchtesgaden-Bischofswiesen als Sohn des Apothekers Fritz Schmidt und seiner Ehefrau, geb. Strobl

Schulbildung: 1945 - 1949 Volksschule Berchtesgaden
1949 - 1958 Realgymnasium Berchtesgaden

Reifeprüfung: Juli 1958 in Berchtesgaden

Wehrdienst: 1960 - 1962

Berufsausbildung:

Praktikantenzeit: 1958 - 1960 Adler-Apotheke in Bad Harzburg

Pharmazeutisches Vorexamen: September 1960 in Braunschweig

Studium der Pharmazie: SS 1962 - WS 1964/65 Universität München

Pharmazeutisches Staatsexamen: Mai 1965

Kandidatenzeit: Mai - Oktober 1965

Wissenschaftliche Arbeit: November 1965 - August 1970
(einjährige Unterbrechung aus beruflichen Gründen); Anleitung Prof. Dr. H. Schönenberger, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München

Berufliche Tätigkeit: seit Januar 1968 Mitarbeiter in der St. Antonius-Apotheke, Berchtesgaden

